



CT/FR 03/02733

REC'D 01 DEC 2003	
WIPO	PCT

15 MAR 2005

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 25 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITE

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



re dépôt

# BREVET D'INVENTION

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 16 sept. 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0211455 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16 SEP. 2002</div>	Alain MICHELET CABINET HARLE ET PHELIP 7 rue de Madrid 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: P334 FR	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>			
Demande de brevet			
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>			
		PRODUIT IMMUNOGENE STABLE COMPRENANT DES HETEROCOMPLEXES ANTIGENIQUES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET PROCEDE DE PREPARATION.	
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>		Pays ou organisation	Date N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>			
Nom	NEOVACS		
Rue	59, Avenue Victor Hugo		
Code postal et ville	75016 PARIS		
Pays	France		
Nationalité	France		
Forme juridique	Société anonyme		
<b>5A MANDATAIRE</b>			
Nom	MICHELET		
Prénom	Alain		
Qualité	CPI: bm [92-1176		
Cabinet ou Société	CABINET HARLE ET PHELIP		
Rue	7 rue de Madrid		
Code postal et ville	75008 PARIS		
N° de téléphone	33 1 53 04 64 64		
N° de télécopie	33 1 53 04 64 00		
Courrier électronique	cabinet@harle.fr		
<b>6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS</b>		Fichier électronique	Pages
Description		desc.pdf	62
Revendications		V	3
Dessins			12
Abrégé		V	1
Listage de séquences			
Rapport de recherche			
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			
Établissement immédiat			

9 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	35.00	1.00	35.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	14.00	210.00
Total à acquitter	EURO			565.00
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b>				
Signé par	Alain MICHELET			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

## DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à des produits immunogènes stables comprenant des hétérocomplexes protéiques immunogènes pour l'obtention d'une réponse immunitaire humorale avec production d'anticorps  
5 spécifiques dirigés à l'encontre d'un ou plusieurs antigènes, en particulier à l'encontre d'un antigène du « soi », ainsi qu'à leur utilisation dans le domaine des vaccins.

## ART ANTERIEUR

10 L'obtention d'une réponse anticorps de haut niveau à l'encontre d'un antigène donné, chez un individu, est un objectif couramment recherché, que l'antigène soit un antigène « étranger » ou un antigène du « soi ».

Toutefois, le problème d'une bonne reconnaissance de l'antigène à l'encontre duquel une réponse anticorps est recherchée, chez un individu,  
15 doit être résolu dans un certain nombre de cas, notamment (a) lorsque l'antigène d'intérêt se comporte comme un « haptène », c'est à dire une structure chimique de faible masse moléculaire qui est peu ou pas immunogénique sous forme libre, mais qui, une fois fixée sur une molécule de haut masse moléculaire, est capable d'induire la production d'anticorps  
20 spécifiques de cet haptène, et (b) lorsque l'antigène d'intérêt est une protéine du « soi », c'est à dire une protéine qui est produite naturellement chez l'individu, pour laquelle il existe une tolérance immunitaire due à la délétion des clones de lymphocytes T correspondants, au cours du développement du système immunitaire.

25 Afin de provoquer, ou d'augmenter, la reconnaissance d'un antigène d'intérêt par les cellules B, on a réalisé diverses constructions immunogènes dans l'état de la technique.

Une première forme de ces constructions immunogènes consiste en un couplage covalent de l'antigène d'intérêt sur une molécule porteuse, la  
30 molécule porteuse apportant des structures reconnues par les lymphocytes T auxiliaires (cellules « T helper »), en association avec des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), et qui activent les lymphocytes T auxiliaires qui produisent alors diverses cytokines, dont l'IL-2, lesquelles cytokines vont à leur tour activer les clones de cellules B  
35 spécifiques de l'antigène d'intérêt. Les cellules B spécifiques de l'antigène

d'intérêt, une fois activées, vont se multiplier et produire des anticorps spécifiques de l'antigène d'intérêt, ce qui est l'objectif recherché. En général, ce type de constructions immunogènes consiste en des produits du couplage chimique covalent entre l'antigène d'intérêt et la molécule porteuse, lesquels, après une étape de purification et élimination des produits non couplés, sont des produits finaux de structure chimique bien définie.

La première forme d'une construction immunogène ci-dessus est par exemple illustrée par l'article de Richard et al. qui décrit la préparation de produits du couplage covalent entre l'IL-9 et l'ovalbumine (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 97(2) : 767-772). Elle est également illustrée dans le brevet américain n° US 6,340,461 (Terman), qui décrit des produits de couplage entre une ou plusieurs copies d'un antigène d'intérêt, à l'encontre duquel une réponse anticorps spécifique est recherchée chez un individu, et une molécule porteuse constituée d'un « Superantigène ». L'antigène d'intérêt est couplé de manière exclusivement covalente à la molécule porteuse, par exemple à l'aide du glutaraldéhyde (aussi appelé « pentanedial »), les produits non couplés de manière covalente étant éliminés afin d'obtenir un produit final chimiquement bien défini.

Eventuellement, le produit du couplage covalent entre l'antigène d'intérêt et le superantigène peut être préparé sous forme d'un polymère dudit produit de couplage, par exemple par fixation non covalente des produits de couplage monomères entre eux, au travers d'interactions ioniques, d'interactions d'adsorption ou encore d'interactions biospécifiques. Par exemple, les produits de couplage monomères peuvent former des complexes avec des molécules hautement chargées positivement ou négativement, grâce à des ponts salins réalisés dans des conditions de faible force ionique. De grands complexes de produits de couplage monomères sont préparés en utilisant des polymères chargés, tels que des polymères poly(acide L-glutamique) ou poly(L-lysine). Selon un autre mode de réalisation d'un polymère de produits de couplage monomères, les produits du couplage exclusivement covalent entre l'antigène d'intérêt et le superantigène peuvent être adsorbés ou couplés de manière non covalente à la surface de microparticules, telles que des billes de latex ou d'autres polymères hydrophobes.

Une seconde forme de ces constructions immunogènes, désignée communément structure « MAP » (pour Multi-Antigenic Protein) se présente en général sous la forme d'un squelette protéique constitué d'un polymère de poly(lysine), linéaire ou branché, sur lequel sont fixés de manière covalente un ou plusieurs antigènes d'intérêt.

Une troisième forme de ces constructions immunogènes consiste en des microparticules sur lesquelles sont fixés le ou les antigènes d'intérêt. On connaît des formes variées de microparticules porteuses d'antigènes.

On connaît par exemple les iscomes (pour « immunostimulating complexes »), qui sont constitués d'un complexe antigénique et d'un adjuvant, le composé QuilA.

On connaît aussi les liposomes, qui possèdent les mêmes désavantages que les iscomes, à savoir notamment une certaine toxicité et des effets immunologiques secondaires, dus à leur manque de pureté.

On connaît également les microparticules biodégradables, comme les polymères d'acide lactique et d'acide glutamique (Aguado et Lambert, 1992, Immuno. Biol., Vol. 184 : 113-125) ou encore des particules d'amidon (Demande de brevet américain n° 2002/0098203 – Gutavsson et al.), dans la matrice polymérique desquelles sont emprisonnés les antigènes d'intérêt. Ces particules libèrent l'antigène sous leur forme soluble pendant la dégradation de la matrice polymérique.

On a aussi décrit des particules constituées exclusivement de protéines recombinantes hybrides, comme décrit dans la demande de brevet français n° FR 2 635 532 (Thiollais et al.).

On connaît également des microsphères poreuses dans lesquels les antigènes sont immobilisés à l'intérieur des micropores par captation ou couplage physique, comme décrit dans le brevet américain n° US 5,008,116 (Cahn).

Toutefois, les différentes solutions proposées dans l'état de la technique ont toutes en commun au moins un inconvénient technique lié à leur mode de préparation, à savoir la perte d'une grande proportion du matériel antigénique d'intérêt, du fait d'une étape obligatoire d'élimination des antigènes non couplés ou non adsorbés.

De plus, si les techniques antérieures permettent de réaliser une association entre un antigène d'intérêt de faible masse moléculaire avec une

molécule porteuse, elles sont en général inadaptées au couplage d'un antigène d'intérêt de haut masse moléculaire, par exemple de plus de 10 kDa, à la molécule porteuse, en raison notamment des encombrements stériques qui interdisent le couplage d'un nombre élevé de molécules d'antigènes d'intérêt de haut masse moléculaire à une même molécule porteuse.

Enfin, la plupart, sinon la totalité, des constructions antigéniques peptidiques connues englobent dans leur structure une seule molécule porteuse, ce qui est un inconvénient technique lorsque l'objectif est d'induire une réponse immunitaire préventive ou thérapeutique à fois contre l'antigène d'intérêt et la molécule porteuse elle-même.

Il existe donc un besoin dans l'état de la technique pour des constructions immunogènes améliorées permettant la production d'un haut niveau d'anticorps spécifiques d'un antigène d'intérêt chez un individu chez lequel une telle réponse immunitaire humorale est recherchée, qui soient peu coûteuses, simples à préparer et qui puissent être synthétisées de manière reproductible.

### **SOMMAIRE DE L'INVENTION**

La présente invention fournit de nouvelles constructions immunogènes permettant de résoudre les divers problèmes techniques rencontrés avec les constructions immunogènes connues dans l'art antérieur et qui permettent de combler les différents besoins techniques décrits ci-dessus.

L'invention a pour objet un produit immunogène stable pour l'induction d'anticorps à l'encontre d'une ou plusieurs protéines antigéniques chez un sujet, caractérisé en ce qu'il comprend des hétérocomplexes immunogènes protéiques constitués d'associations entre (i) des molécules de protéines antigéniques et (ii) des molécules protéiques porteuses et en ce que moins de 40 pour cent des protéines antigéniques (i) sont liées avec les molécules porteuses (ii) par une liaison covalente.

L'invention a aussi pour objet un produit immunogène comprenant des complexes immunogènes protéiques stables pour l'induction d'une réponse immunitaire contre d'une ou plusieurs protéines antigéniques chez un sujet, caractérisé en ce qu'il comprend un complexe comprenant (i) une pluralité de protéines antigéniques et (ii) une molécule protéique porteuse, caractérisé en ce

que, dans ledit produit immunogène, moins de 40 pour cent des protéines antigéniques (i) sont liées aux molécules protéiques porteuses (ii) par une liaison covalente.

De préférence, l'hétérocomplexe immunogène constitutif du produit immunogène de l'invention comprend de 5 à 50 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii), de préférence de 20 à 40 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii).

De préférence, les liaisons covalentes entre une ou plusieurs des protéines antigéniques (i) et les molécules protéiques porteuses (ii) sont réalisées par l'intermédiaire d'un agent chimique de liaison bifonctionnel.

Par molécule d'intérêt antigénique, on entend toute protéine comprenant un ou plusieurs épitopes B de la d'une protéine antigénique native à l'encontre de laquelle la production d'anticorps est recherchée. Ladite molécule d'intérêt antigénique peut consister en la protéine native elle-même ou un dérivé protéique de la protéine native, tels qu'un fragment peptidique de la protéine native, ou encore toute forme biologiquement inactivée de la protéine native obtenue par traitement chimique, physique ou par mutation génétique. La protéine d'intérêt antigénique peut aussi consister en un homo-oligomère ou homo-polymère de la protéine native ou encore en un homo-oligomère ou homo-polymère d'un fragment peptidique de la protéine native. La protéine d'intérêt antigénique peut aussi consister en un hétéro-oligomère ou en un hétéro-polymère comprenant une combinaison de plusieurs fragments peptidiques distincts initialement inclus dans la protéine native.

Selon le mode de réalisation général d'un produit immunogène selon l'invention, la molécule protéique porteuse (ii) est une protéine immunogène induisant la production de lymphocytes T helper et/ou de lymphocytes T cytotoxiques dirigés à l'encontre de cellules présentant à leur surface ladite molécule protéique porteuse, ou tout peptide qui en est dérivé, en association avec des molécules présenteurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), respectivement de classe II et/ou de classe I. La molécule protéique porteuse (ii) peut être également une protéine immunogène induisant à la fois la production de lymphocytes T helper et la production d'anticorps par des lymphocytes B dirigés contre la protéine porteuse.



Selon un mode de réalisation particulier d'intérêt, le produit immunogène est caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est une protéine immunogène induisant la production de lymphocytes cytotoxiques dirigés à l'encontre de cellules présentant à leur surface ladite

5 molécule protéique porteuse, ou tout peptide qui en est dérivé, en association avec des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC).

Les produits immunogènes préférés selon l'invention sont choisis parmi les produits immunogènes comprenant les hétérocomplexes suivants,

10 dans lesquels les protéines antigéniques (i), d'une part et la molécule porteuse protéique (ii), d'autre part, sont respectivement :

- a) (i) IL-4 et (ii) KLH ;
- b) (i) interféron alpha et (ii) KLH ;
- c) (i) VEGF et (ii) KLH ;
- 15 d) (i) IL-10 et (ii) KLH ;
- e) (i) interféron alpha et (ii) gp160 de VIH1
- f) (i) IL-4 et (ii) l'antigène allergène Bet v 1 ; et
- g) (i) le VEGF et (ii) la protéine E7 d'un Papillomavirus.
- h) (i) la protéine Tat de VIH1 biologiquement inactivée et (ii) la protéine
- 20 gp 120 de VIH1.

L'invention est également relative à une composition, notamment une composition pharmaceutique, une composition immunogène ou une composition de vaccin, caractérisée en ce qu'elle comprend un produit immunogène tel que défini ci-dessus.

25 Elle a également trait à un procédé de préparation d'un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) incuber les protéines antigéniques (i) et la molécule porteuse (ii) dans un rapport molaire (i) : (ii) de 5::1 à 50::1, en présence d'un agent
- 30 chimique de liaison;
- b) récupérer le produit immunogène comprenant les hétérocomplexes immunogènes qui est préparé à l'étape a);

## **DESCRIPTION DES FIGURES**

La **Figure 1** illustre la caractérisation du produit immunogène comprenant des hétérocomplexes KLH-VEGF murin par isoélectrofocalisation en gel d'agarose suivie d'une révélation des protéines par immuno-empreinte (« Western Blot »).

5 La **Figure 2** illustre la caractérisation du produit immunogène comprenant des hétérocomplexes KLH-VEGF humain par isoélectrofocalisation avec révélation au Bleu de coomassie, suivie d'une immuno-empreinte (« Western Blot »). A gauche de la Figure est représenté le gel d'isoélectrofocalisation. A droite de la Figure sont représentés les gels  
10 d'immuno-empreinte en utilisant des antorps anti-KLH (à gauche) ou anti-VEGF humain (à droite).

La **Figure 3** illustre la caractérisation du produit immunogène comprenant des hétérocomplexes KLH-IL4 humain par isoélectrofocalisation en gel d'agarose suivie d'une révélation des protéines  
15 par immuno-empreinte (« Western Blot »).

La **Figure 4** illustre la caractérisation du produit immunogène comprenant des hétérocomplexes gp 160-IFN $\alpha$ . par isoélectrofocalisation en gel d'agarose suivie d'une révélation des protéines par immuno-empreinte  
20 (« Western Blot »).

La **Figure 5** illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-VEGF murin, par détermination du titre anticorps obtenu après immunisation des souris. **Figure 5A** : souris immunisées avec le VEGF murin. **Figure 5B** : souris immunisées avec le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes KLH-VEGF. **Figure 5C** : souris témoins  
25 injectées avec l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF).

La **Figure 6** l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-VEGF murin, par détermination du pouvoir neutralisant des anticorps obtenus après immunisation, vis-à-vis de l'activité angiogénique de la protéine VEGF.

La **Figure 7** illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-VEGF humain par détermination du titre anticorps obtenu après immunisation des souris.

La **Figure 8** illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-VEGF humain, par détermination du pouvoir neutralisant des anticorps obtenus après immunisation, vis-à-vis de l'activité angiogénique de la protéine VEGF, mesurée par la prolifération des cellules endothéliales.

La **Figure 9** : illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-IL4 murin par détermination du titre anticorps obtenu après immunisation.

La **Figure 10** illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-IL4 murin par détermination du pouvoir neutralisant des anticorps obtenus après immunisation, vis-à-vis de l'activité d'induction de la prolifération des cellules HT-2 par l'IL4.

La **Figure 11** illustre les résultats de production d'anticorps de classe IgG et IgE dirigés contre le Bet v 1, après l'injection de pollen de bouleau, à des souris préalablement immunisées avec un produit immunogène selon l'invention comprenant des hétérocomplexes KLH-IL4. La **Figure 12** illustre l'activité immunogénique (humorale) du produit immunogène KLH-IL4 humain par détermination du pouvoir neutralisant des anticorps obtenus après immunisation, vis-à-vis de l'activité d'induction de la prolifération des cellules TF-1 par l'IL4.

## 25 **DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION**

L'invention fournit de nouvelles constructions immunogènes induisant un haut niveau de production d'anticorps spécifiques d'un antigène d'intérêt, chez l'individu.

### **Les hétérocomplexes protéiques immunogènes de l'invention**

On a montré selon l'invention que la production d'un haut niveau d'anticorps spécifiques d'un antigène d'intérêt était obtenu, chez un individu, par l'immunisation de cet individu avec un produit immunogène dans lequel ledit antigène d'intérêt est associé à une molécule protéique porteuse, l'association entre ledit antigène d'intérêt et ladite protéine porteuse étant  
35 partiellement covalente et partiellement non covalente.

Plus spécifiquement, on a montré selon l'invention qu'une excellente réponse anticorps à l'encontre d'un antigène d'intérêt est obtenue lorsqu'on immunise un individu avec un produit immunogène stable comprenant des hétérocomplexes protéiques, dans lequel les hétérocomplexes sont constitués d'associations stables entre ledit antigène d'intérêt et ladite molécule protéique porteuse et dans lequel seule une faible proportion de ces associations sont dues à une liaison covalente entre l'antigène d'intérêt et la molécule protéique porteuse, les autres associations entre l'antigène d'intérêt et la molécule protéique porteuse étant réalisées par des liaisons faibles, interactions ioniques, liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals, etc.

En particulier, on a montré selon l'invention qu'une réponse anticorps optimale est atteinte lorsque, dans un produit immunogène stable tel que décrit ci-dessus, moins de 40 pour cent des molécules de l'antigène d'intérêt sont liées par une liaison covalente avec les molécules protéiques porteuses. Selon l'invention, une molécule d'antigène d'intérêt liée à une molécule protéique porteuse par « une » liaison covalente signifie que ladite molécule d'antigène d'intérêt est liée de manière covalente, chimiquement, à ladite molécule protéique porteuse, par au moins une liaison covalente, c'est à dire éventuellement par deux liaisons covalentes ou plus.

Le pourcentage de molécules protéiques porteuses et de protéines antigéniques d'intérêt liées entre elles par des liaisons covalentes dans un produit immunogène de l'invention peut être aisément vérifié par l'homme du métier.

Par exemple, la détermination du pourcentage de molécules d'antigène d'intérêt liées aux molécules de protéine porteuse par une liaison covalente dans un produit immunogène de l'invention peut être réalisée selon les étapes suivantes :

(i) soumettre ledit produit immunogène en solution à des conditions dénaturantes et réductrices,

(ii) réaliser une étape de chromatographie d'exclusion de taille avec le produit obtenu à la fin de l'étape (i) au cours de laquelle les différents constituants protéiques de masse moléculaires décroissants sont élués successivement du support chromatographique d'exclusion de taille.

(iii) mesurer la quantité d'antigène d'intérêt liée par une liaison covalente à la molécule porteuse dans la fraction d'éluat contenant les constituants protéiques ayant le plus haut masse moléculaire ;

(iv) comparer la quantité d'antigène d'intérêt mesurée à l'étape (iii) avec la quantité totale d'antigène d'intérêt inclus initialement dans le produit immunogène de départ.

A l'étape (i) du procédé de détermination du pourcentage de liaisons covalentes décrit ci-dessus, l'incubation d'une quantité donnée (en nombre de moles ou en poids) du produit immunogène de l'invention dans des conditions dénaturantes et réductrices entraîne une dissociation des liaisons faibles entre les différents constituants protéiques non liés entre eux par une liaison covalente.

Des conditions dénaturantes préférées sont la présence d'urée, par exemple à la concentration finale 8M, ou encore la présence de SDS, par exemple à la concentration finale de 1% en poids total de la solution contenant le produit immunogène. Des conditions réductrices préférées sont la présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, par exemple à la concentration finale de 5% du volume total de la solution contenant le produit immunogène.

A l'étape (ii) du procédé de détermination du pourcentage de molécules d'antigène d'intérêt et de molécules de protéine porteuse liées entre elles par des liaisons covalentes, le support de chromatographie d'exclusion de taille est choisi par l'homme du métier selon ses connaissances générales techniques. Par exemple, l'homme du métier peut avoir recours aux supports chromatographiques commercialisés par la Société Pharmacia sous les noms commerciaux de « Superdex 75<sup>TM</sup> » et de « Superdex 200<sup>TM</sup> ».

A l'étape (ii), la fraction moléculaire correspondant à la molécule porteuse liée de manière covalente aux molécules d'antigène d'intérêt est éluee en premier lieu, avant la ou les fractions d'éluat contenant l'antigène d'intérêt sous forme libre. L'antigène d'intérêt qui est élué sous forme libre correspond à la fraction d'antigène d'intérêt, qui n'était pas lié par une liaison covalente à la molécule porteuse, au sein du produit immunogène de départ. C'est sur la fraction protéique de haut masse moléculaire qu'est réalisée la mesure de la quantité d'antigène d'intérêt lié de manière covalente à la molécule protéique porteuse, par exemple dans un test immuno-

enzymatique, dans un test radioimmunologique ou dans un test par immunofluorescence, direct ou indirect (« sandwich »), en utilisant des anticorps spécifiques de l'antigène d'intérêt et qui ne présentent aucune réaction immunologique croisée avec la molécule protéique porteuse.

5 A l'étape (iii), on compare la quantité d'antigène d'intérêt lié de manière covalente à la molécule protéique porteuse, qui a été mesurée comme décrit ci-dessus, à la quantité initiale d'antigène d'intérêt incluse initialement dans la quantité donnée (en nombre de moles ou en poids) du produit immunogène de départ, et on calcule ainsi le pourcentage d'antigène  
10 d'intérêt qui est lié de manière covalente à la molécule protéique porteuse, dans le produit immunogène de l'invention.

A titre illustratif, on a montré selon l'invention que dans le produit immunogène selon l'invention comprenant des hétérocomplexes entre la molécule protéique porteuse KLH (Keyhole limpet hemocyanin) et des  
15 molécules d'interféron alpha humain, seulement 3 % des molécules d'interféron alpha sont liées de manière covalente à la molécule protéique porteuse KLH.

L'invention a pour objet un produit immunogène stable pour l'induction d'anticorps à l'encontre d'une ou plusieurs protéines antigéniques chez un  
20 sujet, caractérisé en ce qu'il comprend des hétérocomplexes immunogènes protéiques constitués d'associations entre (i) des molécules de protéines antigéniques et (ii) des molécules protéiques porteuses et en ce que moins de 40 pour cent des protéines antigéniques (i) sont liées par une liaison covalente avec les molécules protéiques porteuses (ii).

25 L'invention a aussi pour objet un produit immunogène stable comprenant des hétérocomplexes immunogènes protéiques pour l'induction d'anticorps à l'encontre d'une ou plusieurs protéines antigéniques chez un sujet, chaque hétérocomplexe comprenant (i) une pluralité de protéines antigéniques, liées à (ii) une molécule protéique porteuse, caractérisé en ce  
30 que, dans ledit produit immunogène, moins de 40 pour cent des protéines antigéniques (i) sont liées par une liaison covalente avec les molécules protéiques porteuses (ii).

De manière tout à fait préférée, les anticorps dont la production est induite par le produit immunogène de l'invention consistent en des anticorps  
35 « neutralisants » ou « bloquants ». Un anticorps « neutralisant » ou un

anticorps « bloquant » est défini, selon l'invention, comme un anticorps dont la fixation sur la protéine native cible bloque l'activité biologique de cette protéine native, ce qui est un objectif important recherché par l'invention, lorsque la protéine native à l'encontre de laquelle les anticorps sont dirigés possède une activité biologique délétère pour l'organisme, dans le contexte pathologique visé d'un individu à traiter, par exemple lorsque la protéine native possède une activité angiogénique, une activité immunosuppressive ou encore une activité allergénique, notamment une activité d'induction de la production d'interleukine-4.

Par « molécule protéique porteuse », incluse dans le produit immunogène de l'invention, on entend toute protéine ou peptide d'au moins 15 acides aminés de longueur, quelle que soit sa séquence en acides aminés, et qui, en s'associant de manière partiellement covalente aux molécules d'antigène d'intérêt pour former les hétérocomplexes protéiques constitutifs du produit immunogène de l'invention, permet la présentation d'un grand nombre de molécules d'antigène d'intérêt aux lymphocytes B.

Selon un premier aspect, une molécule protéique porteuse consiste en une protéine ou un peptide d'au moins 15 acides aminés de longueur, ou encore en un oligomère d'un tel peptide, comprenant un ou plusieurs épitopes T auxiliaires ("helper") capables d'activer les lymphocytes T auxiliaires (T helper") de l'organisme hôte pour la production de cytokines, y compris l'interleukine 2, cytokines qui vont à leur tour activer et induire la prolifération des lymphocytes B lesquels, après maturation, vont produire des anticorps à l'encontre de la protéine antigénique (i).

Selon un second aspect, une molécule protéique porteuse consiste en une protéine ou un peptide d'au moins 15 acides aminés de longueur, ou encore en un oligomère d'un tel peptide, comprenant outre un ou plusieurs épitopes T auxiliaires ("helper") décrit dans le premier aspect ci-dessus, un ou plusieurs épitopes T-cytotoxiques capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire par production de lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques de la molécule protéine porteuse, ces lymphocytes étant capables de reconnaître spécifiquement des cellules exprimant à leur surface ladite protéine porteuse ou tout peptide qui en est dérivé, en association avec des molécules classes I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC). Le cas échéant, la molécule protéique porteuse

consiste en un oligomère d'une protéine ou d'un peptide comprenant outre un ou plusieurs épitopes T helper, un ou plusieurs épitopes T-cytotoxiques définies ci-dessus.

5 Selon un troisième aspect, une molécule protéique porteuse consiste en une protéine ou un peptide d'au moins 15 acides aminés de longueur, ou encore en un oligomère d'un tel peptide, comprenant outre un ou plusieurs épitopes T auxiliaires ("helper") définis dans le premier aspect, un ou plusieurs épitopes B, capables d'induire la production d'anticorps par des lymphocytes dirigés contre la protéine porteuse.

10 Dans certains modes de réalisation, la protéine porteuse, outre sa fonction T helper, utilisée pour activer une réponse anticorps contre l'antigène d'intérêt, peut aussi activer une réponse cytotoxique contre les cellules porteuses de peptides du carrier et/ou stimuler une réponse anticorps contre la molécule protéique porteuse.

15 La molécule protéique porteuse peut aussi consister en un homo-oligomère ou homo-polymère d'une protéine native dont elle dérive ou encore en un homo-oligomère ou homo-polymère d'un fragment peptidique de la protéine native dont elle dérive. La molécule protéique porteuse peut aussi consister en un hétéro-oligomère ou en un hétéro-polymère  
20 comprenant une combinaison de plusieurs fragments peptidiques distincts initialement inclus dans la protéine native dont elle dérive.

Par « protéine antigénique », on entend selon l'invention toute protéine ou tout peptide d'au moins 10 acides aminés de longueur, y compris un peptide haptène, susceptible d'être reconnue spécifiquement par les  
25 récepteurs pour l'antigène exprimés par les lymphocytes B d'un organisme hôte, humain ou animal, particulièrement tout mammifère, laquelle protéine antigénique, une fois incluse dans un produit immunogène de l'invention, stimule la production d'anticorps reconnaissant ladite protéine antigénique.

Par « protéine antigénique », on entend aussi toute protéine  
30 comprenant un ou plusieurs épitopes B de la d'une protéine antigénique native à l'encontre de laquelle la production d'anticorps est recherchée. Ladite molécule d'intérêt antigénique peut consister en la protéine native elle-même ou un dérivé protéique de la protéine native, tels qu'un fragment peptidique de la protéine native, ou encore toute forme biologiquement  
35 inactivée de la protéine native obtenue par traitement chimique, physique ou



par mutation génétique. La protéine d'intérêt antigénique peut aussi consister en un homo-oligomère ou homo-polymère de la protéine native ou encore en un homo-oligomère ou homo-polymère d'un fragment peptidique de la protéine native. La protéine d'intérêt antigénique peut aussi  
 5 consister en un hétéro-oligomère ou en un hétéro-polymère comprenant une combinaison de plusieurs fragments peptidiques distincts initialement inclus dans la protéine native.

Dans un produit immunogène selon l'invention, avantageusement moins de 30 pour cent, et de préférence moins de 20 pour cent des protéines  
 10 antigéniques (i) sont liées par une liaison covalente avec les molécules protéiques porteuses (ii).

Dans un produit immunogène selon l'invention, avantageusement au moins 1 pour cent, et de préférence au moins 2 pour cent des protéines  
 15 antigéniques (i) sont liées avec les molécules porteuses (ii) par une liaison covalente.

On a montré qu'un produit immunogène de l'invention, tel que défini ci-dessus, était stable en solution aqueuse. La stabilité d'un produit immunogène de l'invention est notamment caractérisée en ce que ledit produit immunogène possède un point isoélectrique propre, distinct du point  
 20 isoélectrique d'au moins l'un de ses constituants protéiques, respectivement la protéine antigénique (i) et la molécule protéique porteuse (ii), et qu'il migre en conséquence selon une bande protéique distincte d'au moins l'une des bandes protéiques correspondant respectivement aux deux éléments protéiques qui le constituent dans des essais d'isoélectrofocalisation.

On a aussi observé, par des essais d'immuno-empreintes (« Western blot »), que le produit immunogène de l'invention migrerait en gel d'électrophorèse, en conditions non dénaturantes, selon une seule bande protéique, ce qui illustre le fait que ledit produit immunogène se présente  
 25 sous la forme d'une population homogène de constructions protéiques solubles.

De plus, on a montré que la protéine antigénique (i) ainsi que la molécule protéique (ii), incluses sous forme d'hétérocomplexes protéiques dans le produit immunogène de l'invention, étaient toutes les deux reconnues par des anticorps reconnaissant spécifiquement chacune de ces protéines.  
 35 Ainsi, le produit immunogène selon l'invention comprend la protéine

antigénique (i) et la molécule protéique porteuse (ii) dans leur conformation native. Cette caractéristique technique du produit immunogène selon l'invention est particulièrement avantageuse pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre des antigènes natifs, c'est-à-dire d'une réponse  
5 immunitaire efficace et réellement protectrice de l'organisme hôte. On a montré en particulier qu'un produit immunogène selon l'invention induisait, dans l'organisme hôte dans lequel il était administré, l'induction d'une forte réponse humorale efficace à l'encontre des antigènes natifs accompagnée de la production d'anticorps neutralisants ou bloquants vis-à-vis de l'activité  
10 biologique délétère de ces antigènes natifs.

On a montré selon l'invention, avec divers antigènes d'intérêt, que la réponse immunitaire humorale obtenue avec un produit immunogène tel que défini ci-dessus était supérieure de 10 à 1000 fois à la réponse immunitaire  
15 humorale obtenue avec une administration d'un conjugué covalent classique entre l'antigène d'intérêt et la molécule protéique porteuse.

De préférence, dans un hétérocomplexe immunogène inclus dans le produit immunogène de l'invention, la pluralité de protéines antigéniques (i) est constituée d'une pluralité d'exemplaires d'une protéine antigénique  
unique.

20 Ainsi, selon un mode de réalisation tout à fait préféré, le produit immunogène de l'invention est mis en œuvre pour l'obtention d'anticorps spécifiques à l'encontre d'un seul antigène d'intérêt.

On a aussi montré selon l'invention qu'un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes tels que définis ci-dessus  
25 était particulièrement bien adapté à l'immunisation d'un individu, par la production d'anticorps, à l'encontre d'un antigène d'intérêt du « soi » (« self antigen »), c'est à dire à l'encontre d'une protéine produite normalement par ledit individu, pour laquelle il existe une tolérance du système immunitaire, en particulier une délétion au moins partielle des clones de lymphocytes T  
30 auxiliaires (cellules T helper) reconnaissant spécifiquement ledit antigène.

En d'autres termes, la présentation d'un antigène du « soi » aux cellules du système immunitaire dudit individu, sous la forme du produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes de l'invention, permet de « casser » la tolérance du système immunitaire de l'individu vis-à-  
35 vis de cet antigène. Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, le

demandeur pense que la possibilité d'obtenir un haut niveau de réponse anticorps à l'encontre d'un antigène du « soi » est due à la présence, au sein de l'hétérocomplexe, de nombreux épitopes de type « T auxiliaire » (ou T helper) portés par la molécule protéique porteuse, qui activent les lymphocytes T auxiliaires, et que les diverses cytokines produites par les lymphocytes T auxiliaires activés, notamment l'IL-2, permet de promouvoir une activation des cellules B à des antigènes du « soi » présentes à l'état dormant dans l'organisme, et de rompre ainsi la tolérance immunitaire des cellules B aux antigènes du « soi ».

Ainsi, selon un mode de réalisation préférentiel, le produit immunogène de l'invention est caractérisé en ce que les protéines antigéniques (i) sont constituées d'une pluralité d'exemplaires d'une protéine normalement reconnue comme une protéine du soi par les cellules du système immunitaire dudit sujet.

Du fait que la plus grande proportion, plus de 60 pour cent, des associations entre l'antigène d'intérêt et la molécule protéique porteuse sont réalisées par des interactions non covalentes, il n'existe aucune limitation théorique dans le nombre de molécules d'antigène d'intérêt associées à une unique molécule protéique porteuse, autre que l'accessibilité stérique des molécules d'antigène d'intérêt à cette molécule porteuse. En particulier, le nombre de molécules d'antigène d'intérêt associées à une même molécule protéique porteuse n'est pas limitée par le nombre de fonctions chimiquement réactives portées par la molécule porteuse permettant la création de liaisons covalentes avec une pluralité de molécules de l'antigène d'intérêt. En conséquence, la seule limite physique semble être le nombre de sites de la molécule protéique porteuse (ii) qui sont accessibles à la protéine antigénique (i).

Pour les mêmes raisons, la taille de l'antigène d'intérêt à associer à la molécule protéique porteuse n'est pas non plus strictement limitée, l'antigène d'intérêt pouvant en conséquence consister en des protéines entières d'au moins 10 kDa, telles les différentes cytokines comme l'IL-4, l'IL-10, le VEGF ou encore l'interféron alpha.

En outre, même pour des antigènes d'intérêt consistant en des protéines entières d'une masse moléculaire supérieur à 10 kDa, un hétérocomplexe immunogène de l'invention peut comprendre une

association de plusieurs antigènes d'intérêt sur une seule molécule porteuse, si la taille de la protéine porteuse le permet.

Lorsque la molécule protéique porteuse est de petite taille, par exemple d'une taille inférieure à 10 kDa, ou encore inférieure à 5 kDa, le demandeur pense, sans vouloir être lié par une quelconque théorie, que les associations partiellement covalentes entre l'antigène d'intérêt et ladite protéine porteuse, qui forment les hétérocomplexes protéiques inclus dans le produit immunogène de l'invention, permettent une conformation des hétérocomplexes telle qu'à la fois l'antigène d'intérêt et la molécule protéique porteuse sont accessibles aux récepteurs des cellules du système immunitaire.

Il s'agit même d'un avantage technique supplémentaire procuré par le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes tels que définis ci-dessus, puisque la présentation aux lymphocytes B d'une pluralité d'exemplaires d'un antigène d'intérêt sur une même molécule porteuse, comprise dans l'hétérocomplexe, favorise le phénomène de « capping » par « cross-linking » des récepteurs de la cellule B reconnaissant l'antigène, ce qui contribue à l'activation de la cellule B qui reçoit, par ailleurs, les signaux d'activation provenant des cytokines produites par les lymphocytes T auxiliaires activés grâce aux épitopes T auxiliaires portés par la molécule protéique porteuse.

Ainsi, selon un mode de réalisation tout à fait préféré du produit immunogène, celui-ci comprend de 5 à 50 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii), de préférence de 20 à 40 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii).

Le nombre de molécules d'antigène d'intérêt sur une seule molécule protéique porteuse dépend respectivement de la taille de la molécule porteuse et de la taille de la molécule d'antigène d'intérêt. Plus la molécule porteuse est grosse et offre une grande surface d'association avec l'antigène d'intérêt, et plus l'hétérocomplexe immunogène comprendra, pour une seule des molécules porteuses qu'il contient, un nombre élevé d'exemplaires de la molécule d'antigène d'intérêt. De même, plus la taille de la molécule d'antigène d'intérêt est réduite, plus le nombre d'exemplaires de la molécule d'antigène d'intérêt sur la même molécule porteuse est grand.

A titre illustratif, on a montré selon l'invention que lorsque la molécule protéique porteuse est le KLH, de 20 à 40 molécules d'IL-4, d'IL-10, d'interféron alpha ou de VEGF sont associés avec chaque molécule porteuse.

5 On a montré que la solubilité du produit immunogène dans une solution aqueuse varie avec la modification des équilibres régissant les interactions moléculaires au sein des hétérocomplexes, en particulier les équilibres électrochimiques qui dépendent de liaisons dites « faibles » (non covalentes) ou encore les concentrations respectives des protéines  
10 antigéniques et de la molécule protéique porteuse, ainsi qu'avec les conditions de force ionique, de pH et de température.

De préférence, les liaisons covalentes entre une ou plusieurs des protéines antigéniques (i) et la molécule protéiques porteuse (ii) sont réalisées par l'intermédiaire d'un agent chimique de liaison bifonctionnel.

15 Un tel agent chimique peut être le bromure de cyanogène, le glutaraldéhyde, le carbodiimide ou l'anhydride succinique.

En tant que carbodiimides, on peut utiliser par exemple les composés suivants : 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4-ethyl)carbodiimide (CMC), 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and 1-ethyl-3-(4-azonia-  
20 4,4-diméthylpentyl)carbodiimide, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4-ethyl)carbodiimide,(1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl carbodiimide (EDC) et 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-diméthylpentyl)carbodiimide.

En tant qu'agents de couplage homo-bifonctionnels, on peut citer les composés suivants :

25 - esters de N-hydroxysuccinimide, de dithiobis (succinimidylpropionate), disuccinimidyl suberate, et disuccinimidyl tartrate; les imidoesters bifonctionnels diméthyl adipimidate, diméthyl pimelimidate, et diméthyl suberimidate;

30 - les agents réactifs avec un sulphydryl, 1,4-di-[3'-(2'-pyridyldithio)propionamido]butane, bismaleimido-hexane, et bis-N-maleimido-1, 8-octane;

- les halogénures bifonctionnels de type aryle 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene et 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfone;

35 - le SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate) ;

- le SIAB (N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate),
- le SMPB (succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate),
- le GMBS (N-(.gamma.-maleimidobutyryloxy)succinimide ester),
- le MPBH (4-(4-N-maleimidophenyl) acide butyrique hydrazide) ;
- 5       - le     M2C2H     (4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl-  
hydrazide),
- le     SMPT     (succin-imidyloxycarbonyl-.alpha.-methyl-.alpha.-(2-  
pyridyldithio)toluène) ; et le
- SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate).

10       Préférentiellement, l'agent chimique de liaison utilisé comprend au moins deux fonctions aldéhyde réactives.

De manière tout à fait préférée, l'agent chimique de liaison est le glutaraldéhyde.

15       Après formation du produit comprenant les hétérocomplexes protéiques grâce au couplage des molécules protéiques porteuses avec les protéines antigéniques à l'aide de l'agent chimique de liaison, le produit obtenu peut être stabilisé grâce à un agent de stabilisation des protéines, tel que le formaldéhyde, susceptible de créer des liaisons intrachaine.

20       Les produits immunogènes comprenant des hétérocomplexes immunogènes de l'invention se présentent sous la forme de microparticules solubles en solution, en particulier en solution aqueuse, dont la taille moyenne varie selon (i) la taille de la molécule protéique porteuse, (ii) la taille et le nombre de protéines antigéniques associées à une même molécule protéique porteuse et (iii) le nombre molécules porteuses associées aux  
25       protéines antigéniques présentes dans une particule d'hétérocomplexe.

On a observé que les microparticules d'hétérocomplexes décrites dans les exemples avaient une taille moyenne variant de 100 nm à 300 nm.

30       De manière tout à fait préférée, un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes protéiques immunogènes de l'invention comprend exclusivement des molécules porteuses associées aux protéines antigéniques, à l'exclusion de tout autre matériau. En particulier, un hétérocomplexe de l'invention ne comprend aucun matériau polymère, protéique ou non protéique, autre que les protéines porteuses et antigéniques qui le caractérisent.

Récemment, ZAGURY D et al. (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(14) : 8024-8029), dans une étude bibliographique, suggèrent d'induire une immunité anti-cytokine chez les patients afin de contrecarrer la production anormale dans ces pathologies de certaines cytokines, notamment des interleukines, lymphokines, monokines, interférons qui agissent physiologiquement dans les tissus, localement comme facteur de prolifération, de différenciation ou de mort programmée cellulaire.

Ces auteurs précisent que les stratégies de thérapeutique vaccinale ont été, jusqu'à aujourd'hui, exclusivement ciblées sur l'agresseur antigénique, que ce soit un microorganisme, une cellule ou un allergène, mais n'ont jamais recherché à combattre la dérégulation des cytokines induites sous l'effet de l'agresseur. Ces auteurs proposent une vaccination anti-cytokine en tant que préalable à une vaccination conventionnelle dont le but serait de neutraliser ou de bloquer les effets immunotoxiques du stroma, et de permettre le déroulement normal de la réaction immunitaire adaptée contre l'agresseur antigénique.

De plus, des travaux antérieurs de la demanderesse, relatés dans la demande Internationale publiée sous le n°WO 00/03732, ont montré que, dans le cas de la leucémie ATL, du cancer du col utérin, et du sarcome de Kaposi, respectivement trois protéines étaient impliquées dans une immunosuppression locale au niveau de tumeurs ou de cellules infectées par le VIH1:

- la protéine Tax du virus HTLV 1,
- la protéine E7 du papillomavirus et
- la protéine Tat du virus VIH-1.

La demanderesse avait aussi décrit que certaines de ces protéines immunosuppressives, telles la protéine Tat du HIV1 et la protéine E7 de HPV (souches 16 et 18) ont également des effets activateurs sur les cellules endothéliales vasculaires.

Elle avait en conséquence proposé la mise au point de vaccins anti-cancer ou anti-viraux comprenant un composé immunogène dérivé détoxiqué d'une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires stromales, initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale, comme par exemple une protéine dérivée de la protéine Tat du virus HIV1, la protéine Tax d'un

virus HTLV1, la protéine E7 d'un papillomavirus ou encore une lectine mannane-dépendante, sous une forme inactivée.

Or, il est montré selon l'invention que le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes tels que définis ci-dessus permet l'induction d'une forte réponse anticorps à l'encontre des différentes molécules antigéniques délétères ci-dessus.

Selon un premier aspect, dans l'hétérocomplexe immunogène de l'invention, la ou les protéines antigéniques (i) consistent en des cytokines produites naturellement par ledit sujet.

De manière préférée, la ou les protéines antigéniques (i) sont choisies parmi l'interleukine-4, l'interféron alpha, l'interféron gamma, le VEGF, l'interleukine-10, le TNF alpha, le TGF bêta, l'interleukine-5 et l'interleukine 6.

Selon un second aspect, la ou les protéines antigéniques (i) constitutives d'un hétérocomplexe immunogène de l'invention sont des protéines immunosuppressives ou angiogéniques, ou des protéines dérivées de protéines immunosuppressives ou angiogéniques.

De manière préférée, que la ou les protéines antigéniques (i) sont choisies parmi la protéine E7 d'un papillomavirus, la protéine Tat du virus VIH 1, la protéine Tax d'u virus HTLV 1 ou HTLV 2 et la protéine p53 du soi.

La molécule protéique porteuse (ii) incluse dans un hétérocomplexe protéique immunogène de l'invention peut être une molécule porteuse utilisée conventionnellement en immunologie, telle que le KLH, l'ovalbumine, l'albumine sérique bovine (ASB), le Tétanos toxoïde, la toxine cholérique B, etc.

De plus, dans un produit immunogène de l'invention, la molécule porteuse protéique peut être choisie de manière à induire ou à stimuler, outre la production de lymphocytes T helper, une réponse immunitaire cytotoxique et/ou humorale à l'encontre d'elle-même et de sa contrepartie de protéine native dans l'organisme hôte, respectivement par l'activation de lymphocytes T cytotoxiques et de lymphocytes B spécifiques de cette molécule porteuse.

Ce mode de réalisation particulier d'un produit immunogène de l'invention est particulièrement utile lorsque l'on recherche simultanément une réponse anticorps efficace à l'encontre d'une protéine délétère immunosuppressive ou angiogénique, notamment par la production d'anticorps neutralisants ou bloquants, et une réponse immunitaire cellulaire



effectuée par des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre des cellules présentant à leur surface l'antigène natif associé aux molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), par exemple un antigène d'un pathogène comme le virus VIH1 ou un Papillomavirus, ou un antigène spécifiquement exprimé dans les cellules cancéreuses, comme le CEA, la p53, le Di12, etc.

Ainsi, selon ce mode de réalisation particulier, le produit immunogène de l'invention est caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est une protéine immunogène induisant, outre la production de lymphocytes T helper, la production de lymphocytes T cytotoxiques dirigés à l'encontre de cellules présentant à leur surface ladite molécule protéique porteuse, ou tout peptide qui en est dérivé, en association avec des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), et/ou la production d'anticorps par des lymphocytes B dirigés contre la protéine porteuse.

Ainsi, les produits immunogènes comprenant des hétérocomplexes immunogènes de l'invention constituent des moyens immunologiques efficaces pour la vaccination thérapeutique active d'un individu, qu'il soit un mammifère humain ou un mammifère non humain, à l'encontre d'une grande diversité de pathologies.

Des exemples illustratifs de composition d'hétérocomplexes immunogènes contenus dans un produit immunogène selon l'invention pour prévenir ou traiter, par une vaccination thérapeutique active, des pathologies diverses sont indiqués ci-dessous.

*a) Pour la prévention ou le traitement du SIDA :*

- Molécule protéique porteuse (ii) : les protéines gp 120, gp160, p24, p17, nef, ou Tat du virus HIV1, détoxiquées ou stabilisées si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Zagury et al., 1998).

- Protéine antigénique (i) : les protéines Tat, IFN $\alpha$ , IL10 et TGF $\beta$ , détoxiquée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou une protéine immunogène qui en est dérivée.

*b) Pour la prévention ou le traitement du cancer du col utérin :*

- Molécule protéique porteuse (ii) : les protéines L1, L2 et E7 du papillomavirus, préférentiellement d'un papillomavirus de la souche 16 ou 18,

détoxiquée ou stabilisée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Le Buanec et al., 1999).

- Protéine antigénique (i) : les protéines E7, IFN $\alpha$ , IL10, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  et VEGF, 5 détoxiquées ou stabilisées si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou une protéine immunogène qui en est dérivée.

c) *Pour la prévention ou le traitement de la leucémie ATL induite par les virus HTLV1 ou 2:*

- 10 - Molécule protéique porteuse (ii) les protéines gp61 et Tax des virus HTLV1 ou 2, détoxiquée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Cowan et al., 1997 ; Mori et al., 1996).

- Protéine antigénique (i) : les protéines Tax, IL10, IFN $\alpha$  ou TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , 15 VEGF détoxiquées, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine qui en est dérivée.

d) *Pour la prévention ou le traitement du cancer du colon :*

- 20 - Molécule protéique porteuse (ii) : les protéines CEA et p53, détoxiquées si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Zusman et al., (1996).

- Protéine antigénique (i) : les protéines IFN $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL10, FasL et VEGF, 25 détoxiquées, des fragments peptidiques immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée.

e) *Pour la prévention ou le traitement du cancer du sein :*

- Molécule protéique porteuse (ii) : la protéine Di12, des fragments 30 immunogènes de cette protéine ou encore une protéine qui en est dérivée (Yoshiji et al., 1996).

- Protéine antigénique (i) : les protéines TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  et VEGF, détoxiquées si nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une 35 protéine immunogène qui en est dérivée.

f) *Pour la prévention ou le traitement du cancer du pancréas :*

- Molécule protéique porteuse (ii) : la protéine CaSm, détoxiquée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de cette protéine ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée.
- Protéine antigénique (i) : les protéines VEGF et  $TNF\alpha$ , détoxiquées ou stabilisées si nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée.

*g) Pour la prévention ou le traitement du cancer de la prostate :*

- Molécule protéique porteuse (ii) : les protéines OSA et ETS2, détoxiquées ou stabilisées si nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée. (Sementchenko VI et al., 1998).
- Protéine antigénique (i) : les protéines IL6 et  $TGF\beta$ , détoxiquées ou stabilisées si nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée. (Adler et al., 1999).

*h) Pour la prévention ou le traitement de certaines allergies :*

- Molécule protéique porteuse (ii) est choisi parmi les allogènes moléculaires, tels que les protéines Bet v 1 (pollen de bouleau), Der p 1 (acarien) et Fel d 1 (chat) , leurs fragments peptidiques immunogènes ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée. L'antigène Bet v 1 est décrit notamment par Ferreira et al. (1993), l'antigène Der p 1 est décrit notamment par Tovey et al. (1981) et l'antigène Fel d 1 est décrit notamment par Morgenstern et al. (1991)
- Protéine antigénique (i) : elle induit la production d'anticorps neutralisants ou bloquants à l'encontre du facteur cytokinique IL4, qui est produit principalement par les lymphocytes T de type Th2, qui orientent la réponse immunitaire humorale vers la production d'anticorps d'isotype IgE. Selon un autre mode de réalisation, la protéine antigénique (i) induit la production d'anticorps neutralisants ou bloquants à l'encontre du facteur cytokinique IL5, qui est produit principalement par les lymphocytes T de type Th2.

Ainsi selon un premier aspect particulier d'un produit immunogène de l'invention, dans lequel la molécule protéique porteuse induit à la fois la production de lymphocytes T auxiliaires (« T helper »), de lymphocytes T cytotoxiques et de lymphocytes B spécifiques de la molécule protéique

porteuse, ladite molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines L1, L2 et E7 d'un Papillomavirus.

Selon un second aspect particulier d'un produit immunogène de l'invention, dans lequel la molécule protéique porteuse induit, outre la production de lymphocytes T auxiliaires (« T helper »), la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques et de lymphocytes B spécifiques de la molécule protéique porteuse, ladite molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines gp160, p24, p17, Nef et Tat du virus HIV1.

Selon un troisième aspect particulier d'un hétérocomplexe immunogène de l'invention, dans lequel la molécule protéique porteuse induit à la fois la production de lymphocytes T auxiliaires (« T helper ») lymphocytes T cytotoxiques et de lymphocytes B spécifiques de la molécule protéique porteuse, ladite molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines CEA, p53, Di12, CaSm, OSA et ETS2.

Selon un quatrième aspect particulier d'un produit immunogène de l'invention, dans lequel la molécule protéique porteuse induit, outre la différenciation de lymphocytes T auxiliaires (« T helper ») la production d'anticorps dirigés contre la molécule protéique porteuse, ladite molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines Bet v 1, Der p 1 et Fel d 1.

Dans un produit immunogène de l'invention, les hétérocomplexes protéiques immunogènes préférés sont choisis parmi les hétéro complexes suivants, dans lesquels les protéines antigéniques (i), d'une part et la molécule porteuse protéique (ii), d'autre part, sont respectivement :

- a) (i) IL-4 et (ii) KLH ;
- b) (i) interféron alpha et (ii) KLH ;
- c) (i) VEGF et (ii) KLH ;
- d) (i) IL-10 et (ii) KLH ;
- e) (i) interféron alpha et (ii) gp160 de VIH1
- f) (i) IL-4 et (ii) l'antigène allergène Bet v 1 ; et
- g) (i) le VEGF et (ii) la protéine E7 d'un Papillomavirus.
- h) (i) la protéine Tat inactivée de VIH1 et (ii) la protéine gp 120 de VIH1.

**Procédé de préparation d'un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes protéiques immunogènes de l'invention**

L'invention a encore pour objet un procédé de préparation d'un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) incuber les protéines antigéniques (i) et la molécule porteuse (ii) dans un rapport molaire (i) : (ii) de 5::1 à 50::1, en présence d'un agent chimique de liaison;
- b) récupérer le produit immunogène comprenant les hétérocomplexes immunogènes préparé à l'étape a);

De préférence, l'agent chimique de liaison est le glutaraldéhyde.

- 10 De manière tout à fait préférée, le procédé est en outre caractérisé en ce que l'étape a) est suivie d'une étape de stabilisation du produit comprenant les hétérocomplexes immunogènes par le formaldéhyde, préalablement à l'étape b) de récupération des hétérocomplexes.

- 15 De préférence, lorsque le glutaraldéhyde est utilisé comme agent chimique de liaison, il est présent dans le milieu réactionnel de couplage à une concentration finale comprise entre 0,02 M et 0,03M, de préférence à la concentration finale de 0,026M.

- 20 La réaction de couplage avec le glutaraldéhyde est avantageusement réalisée, pendant 20 minutes à 60 minutes de préférence 30 minutes, à température allant de 20 à 25°C.

Après l'étape de couplage, le glutaraldéhyde en excès est éliminé, par exemple par dialyse à l'aide d'une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure de 3 kDa. L'étape de dialyse est avantageusement réalisée à 4°C, dans un tampon ajusté à pH 7,6.

- 25 Pour stabiliser le produit comprenant les hétérocomplexes protéiques préparé à l'étape a), ledit produit peut être traité en solution par le formaldéhyde, par exemple par du formaldéhyde à la concentration finale de 3 mM. La réaction de stabilisation a avantageusement une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence entre 20 et 30 heures et est de manière tout à fait préférée d'une durée de 24 heures. La réaction de stabilisation par  
30 le formaldéhyde est avantageusement stoppée par addition de glycine, de préférence à la concentration de 0,1 M, pendant 1 heure et à une température comprise entre 20 et 25°C.

**Les compositions comprenant un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes protéiques immunogènes de l'invention**

La présente invention a aussi pour objet une composition comprenant un produit immunogène tel que défini ci-dessus.

5 L'invention est également relative à une composition pharmaceutique comprenant un produit immunogène protéique tel que défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet une composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, un produit immunogène tel que défini ci-dessus, en association avec un ou plusieurs  
10 excipients physiologiquement compatibles.

Elle a également trait à une composition vaccinale caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, un produit immunogène tel que défini ci-dessus, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

15 Selon les objectifs poursuivis, on utilise des adjuvants systémiques ou des adjuvants mucosaux. Par exemple, on utilise de préférence un adjuvant mucosal pour prévenir les cancers des tissus épithéliaux et on utilise de préférence des adjuvants systémiques pour prévenir ou traiter les infections par des virus, tels que par HIV1 et HTLV1, ou encore pour prévenir ou traiter  
20 les allergies.

Parmi les adjuvants systémiques, on utilise de préférence les adjuvants de type IFA (Adjuvant Incomplet de Freund), le phosphate de calcium ou l'hydroxyde d'alumine.

25 Parmi les adjuvants mucosaux, on utilise de préférence des adjuvants comme la chloratoxine B (CTB) ou un mutant de la toxine LT (LT $\mu$ ).

Selon un aspect particulier, une composition immunogène selon l'invention comprend aussi un ou plusieurs agents immuno-stimulants, en combinaison avec un adjuvant de l'immunité, comme par exemple l'agent immuno-stimulant CpG bien connu dans l'état de la technique.

30 Elle a également trait à un vaccin, mucosal ou systémique, caractérisé en ce qu'il comprend, à titre de principe actif, un produit immunogène tel que défini ci-dessus, en association avec un ou plusieurs excipients, dont des adjuvants d'immunité, physiologiquement compatibles.

35 Les compositions immunogènes ou les vaccins selon la présente invention trouvent leur emploi par exemple dans le traitement tant curatif que

préventif des cancers, notamment des cancers induits par des virus comme par exemple, l'ATL (Acute T cell leukemia) causé par le HTLV1, ou le cancer du col utérin causé par le papillomavirus, ou encore le lymphome de Burkitt ou le sarcome de Kaposi causés par des virus de la famille herpès, respectivement l'Epstein-Barr (EBV) et le HHV8 ainsi que dans le traitement du SIDA, ainsi que pour prévenir ou traiter les réactions allergiques.

Les produits immunogènes selon l'invention peuvent être utilisés comme suit :

On administre à un patient, sous une forme adaptée à l'administration systémique ou mucosale, un produit immunogène comprenant des hétérocomplexes protéiques immunogènes selon la présente invention, par exemple par voie intranasale, en quantité suffisante pour être efficace sur le plan thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée peut aller par exemple de 10 à 1000 µg par voie intranasale, une fois par semaine pendant deux mois, puis, compte tenu du caractère transitoire de la réponse anticorps dirigée contre l'antigène d'intérêt, périodiquement en fonction du taux des anticorps sériques, par exemple tous les 2-6 mois.

On pourra administrer dans une même préparation deux ou plusieurs produits immunogènes différents pour induire des anticorps neutralisant tous les sites fonctionnels délétères au cas où une seule molécule ne porte pas tous les sites actifs de la toxine ou de la cytokine surproduite que l'on veut neutraliser.

A titre de médicaments, les produits immunogènes de l'invention peuvent être incorporés dans des compositions pharmaceutiques destinées à une administration par voie systémique ou bien à une administration par la voie muqueuse, notamment oro-muqueuse, en particulier la voie intranasale, la voie orale et la voie vaginale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain intervalle de temps.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet une composition pharmaceutique, curative ou préventive, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, un ou plusieurs produits immunogènes tels que définis ci-dessus. Le produit immunogène peut être conditionné seul ou mélangé à un excipient ou mélange d'excipients pharmaceutiquement acceptables tel qu'un adjuvant. Parmi les excipients

destinés à la voie intranasale ou orale, on retient particulièrement les capryl caproyl macrogol glycérides comme le Labrasol® de la Société GATTEFOSSE ou l'hydroxyde d'alumine (Alhydrogel, Superfos, Danemark).

Pour l'administration orale selon l'invention, on associera le principe  
5 actif à un adjuvant d'immunité mucosale tel qu'un mutant de CT, de LT ou de CTB.

On retient tout particulièrement les formes galéniques décrites par Boyaka et al. « Strategies for mucosal vaccine development » dans Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(4), 1999, pages 35-45. On peut citer aussi les  
10 microgranules gastro résistantes, notamment bioadhésives telles que ceux décrits par Rojas et al dans Pharmaceutical Research, vol.16, n°2, 1999, page 255.

Dans des conditions particulières de mise en œuvre, on retient une composition pharmaceutique vaccinale ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle  
15 comprend un adjuvant d'immunité mucosale, tel un mutant de CT (cholera toxine) ou de LT (entérotoxine labile d'E. coli).

Dans d'autres conditions particulières de mise en œuvre, on retient une composition pharmaceutique vaccinale ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle renferme un adjuvant absorbant le principe actif, tels l'hydroxyde  
20 d'alumine où les particules d'or.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition ci-dessus décrite, caractérisé en ce que l'on mélange, selon des méthodes connues en elles-mêmes, le ou les produits immunogènes actifs avec des excipients acceptables, notamment  
25 pharmaceutiquement acceptables et le cas échéant, avec un adjuvant d'immunité systémique ou mucosale.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé ci-dessus, on prépare des microgranules bioadhésives et gastrorésistantes pour la voie orale digestive renfermant les principes actifs immunogènes et le  
30 cas échéant les adjuvants.

La présente invention est en outre illustrée par les exemples suivants :

### EXEMPLES

35 Exemples de préparations d'hétérocomplexes :



**Exemple 1 : préparation de l'hétérocomplexe KLH-VEGF murin**

0,58 mg de protéine KLH sont dissous dans 0,5 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de VEGF murin dissous dans 1 ml du même tampon.

5 Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune effectuées dans un boudin de dialyse dont  
10 le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 24 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante.

15 Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

**Exemple 2 : Hétérocomplexe KLH-VEGF humain.**

Cet hétérocomplexe représente le principe actif d'un vaccin propre à  
20 induire principalement chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent le VEGF humain.

0,58 mg de protéine KLH sont dissous dans 0,5 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de VEGF humain dissous dans 1 ml du même tampon.

25 Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune, effectuées dans un boudin de dialyse  
30 dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 24 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

### **Exemple 3 : préparation d'un hétérocomplexe KLH-IL4 murin.**

0,841 mg de protéine KLH sont dissous dans 0,8 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de IL4 murin dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune effectuées dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 24 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

### **Exemple 4 : préparation d'un hétérocomplexe KLH-IL4 humain.**

Cet hétérocomplexe représente le principe actif d'un vaccin propre à induire principalement chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent l'IL4 humain.

1 mg de protéine KLH sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de protéine IL4 murine dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune effectuées dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 24 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

#### **Exemple 5 : préparation d'un complexe KLH-IFN $\alpha$ .**

Ce conjugué représente le principe actif d'un vaccin propre à induire principalement chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent l'IFN $\alpha$  humain.

0,625 mg de protéine KLH sont dissous dans 0,6 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de protéine IFN $\alpha$  humaine dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune effectuées dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 48 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

#### **Exemple 6 : préparation d'un complexe gp160-IFN $\alpha$ .**

Cet hétérocomplexe représente le principe actif d'un vaccin propre à induire chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent à la fois la protéine de structure gp160 du virus HIV-1 et la protéine IFN $\alpha$ , cytokine immunosuppressive. De plus cet hétérocomplexe doit permettre d'induire une réaction cellulaire (chimioquinas, T auxiliaire, CTL) dirigée contre les cellules infectées exprimant la gp160.

0,380 mg de protéine gp160 sont dissous dans 0,380 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de protéine IFN $\alpha$  humaine dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

L'excès de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

Le mélange est alors traité par du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM pendant 48 heures. Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange est enfin dialysé dans les mêmes conditions que la dialyse effectuée précédemment.

**Exemple 7 : préparation d'un hétérocomplexe gp160-Tat toxoïde. (La protéine Tat est inactivée de manière biochimique)**

Cet hétérocomplexe représente le principe actif d'un vaccin propre à induire chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent à la fois la protéine de structure gp160 du virus HIV-1 et la protéine Tat extracellulaire du VIH-1. De plus ce complexe doit permettre d'induire réaction cellulaire (chimiokines, T auxiliaire, CTL) dirigée contre les cellules infectées exprimant la gp160.

0,550 mg de protéine gp120 sont dissous dans 0,550 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de protéine Tat toxoïde dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante L'excès de glycine est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

**Exemple 8 : préparation d'un hétérocomplexe gp160-Tat GM. (La protéine Tat est inactivée de manière génétique)**

Cet hétérocomplexe représente le principe actif d'un vaccin propre à induire chez le vacciné la production d'anticorps qui neutralisent à la fois la protéine de structure gp160 du virus HIV-1 et la protéine Tat de régulation du VIH-1. De plus cet hétérocomplexe doit permettre d'induire réaction cellulaire (chimiokines, T auxiliaire, CTL) dirigée contre les cellules infectées exprimant la gp160.

0,550 mg de protéine gp160 sont dissous dans 0,550 ml de tampon phosphate 10 mM pH 8,5. A cette solution sont ajoutés 1 mg de protéine Tat GM dissous dans 1 ml du même tampon.

Le mélange de protéine ainsi obtenu est traité par du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,026 M pendant 30 minutes à température ambiante.

Puis la réaction est bloquée par addition de glycine 0.1 M finale pendant 1 heure à température ambiante. L'excès de glycine est ensuite éliminé par 3 dialyses successives de 2 heures chacune dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 3 kDa, à 4 °C, contre 200 ml de tampon phosphate pH 7,6 10 mM.

## 10 Exemples de caractérisations biochimiques des hétérocomplexes

### A. Matériel et Méthodes des exemples 9 à 16.

Les caractérisations biochimiques des hétérocomplexes ont été effectuées à l'aide des techniques suivantes :

#### 15 1. Test d'antigénicité :

L'étude de l'antigénicité d'un hétérocomplexe par rapport à l'antigénicité des protéines qui le composent est effectuée par un ELISA indirect classique. Cette technique permet de mesurer quantitativement une protéine par reconnaissance spécifique d'un anticorps contre un antigène. Ce test consiste à déposer des dilutions d'un échantillon contenant la protéine recherchée dans des puits d'une plaque de microtitration. Un anticorps polyclonal spécifique réagit avec la protéine immobilisée. Un deuxième anticorps, conjugué à la peroxydase de raifort, spécifique du premier est ensuite ajouté. Le complexe formé est révélé par incubation avec de l'OPD. La couleur jaune obtenue est directement proportionnelle à la quantité de protéines fixées. L'absorbance (DO) de chaque puits est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques. La quantité de protéine présente dans l'échantillon est déterminée alors à l'aide d'une gamme d'étalonnage.

30

#### 2. Isoélectrofocalisation en gel d'agarose suivie d'un Western Blot.

L'isoélectrofocalisation en gel d'agarose permet de séparer les molécules en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans des conditions non

dénaturantes, ce qui nous permet d'étudier les hétérocomplexes sans détruire les liaisons faibles existant au sein de ces complexes.

L'isoélectrofocalisation est suivie d'une révélation par Western blot. Après séparation électrophorétique, les molécules sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par capillarité. Ces molécules sont ensuite caractérisées par immunochimie.

### 3. Estimation du pourcentage des molécules d'antigène d'intérêt liée à la molécule protéique porteuse par une liaison covalente.

L'estimation du pourcentage des molécules d'antigène d'intérêt liées aux molécules protéiques porteuses par une liaison covalente dans un produit immunogène est effectuée par exemple par tamisage moléculaire sur une colonne contenant du Superdex 200, dans des conditions dénaturantes (urée 8 M) et réductrices (beta-mercaptoéthanol 5%).

Le % de molécules d'antigène d'intérêt liées par une liaison covalente est déduit de la quantité d'antigène d'intérêt (déterminée par un ELISA indirect classique) présente dans le volume d'exclusion de la colonne. En effet, la molécule protéique porteuse, telle le KLH, ayant une masse moléculaire plus importante que la limite supérieure de fractionnement de la colonne utilisée (200 kDa dans notre cas), sort dans le volume d'exclusion de cette colonne. Ainsi, dans des conditions dénaturantes et réductrices, seuls les antigènes d'intérêt liés de manière covalente à la molécule protéique porteuse sortent dans le volume d'exclusion.

### Exemple 9 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe KLH-

#### VEGF murin

##### 1. L'antigénicité

L'hétérocomplexe KLH-VEGF murin présente une antigénicité identique à l'antigénicité du VEGF murin.

##### 2. Isoélectrofocalisation en gel d'agarose suivie d'un Western Blot.

La figure 1 montre que l'hétérocomplexe KLH-VEGF murin migre sous la forme d'une seule bande à un pI différent des molécules natives le constituant.

#### 5 **Exemple 10 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe KLH-VEGF humain**

##### 1. Antigénicité :

L'hétérocomplexe KLH-VEGF humain présente une antigénicité identique à l'antigénicité du VEGF humain.

##### 10 2. Isoélectrofocalisation suivie d'un Western Blot.

La figure 2 montre que l'hétérocomplexe KLH-VEGF humain migre sous la forme d'une seule bande à un pI différent des molécules natives le constituant. L'échantillon de VEGF humain a été déposé à trois endroits différents afin de montrer qu'il migre toujours au même endroit.

#### 15 **Exemple 11 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe KLH-IL4murin**

##### 1. Antigénicité

20 L'hétérocomplexe KLH-IL4 murin présente une antigénicité identique à l'antigénicité de l'IL4 murin.

#### **Exemple 12 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe KLH-IL4 humain**

##### 25 1. Antigénicité

Le complexe KLH-IL4 humain présente une antigénicité égale à l'antigénicité de la protéine IL4 humain.

##### 2. Isoélectrofocalisation suivie d'un Western Blot.

30 La figure 3 montre que l'hétérocomplexe KLH-IL4 humain migre sous la forme d'une seule bande à un pI différent des molécules natives le constituant.



**Exemple 13 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe KLH-IFN $\alpha$**

**1. Antigénicité**

Le complexe KLH-IFN $\alpha$  humain présente une antigénicité identique à l'antigénicité de l'IFN $\alpha$  humain.

**2. Estimation du pourcentage des molécules d'antigène d'intérêt liées à la molécule protéique porteuse par une liaison covalente.**

La préparation KLH-IFN $\alpha$  a été passée sur une colonne superdex S200 selon les conditions décrites plus haut. Le pic sorti dans le volume d'exclusion a été collecté, dialysé puis lyophilisé. La concentration en antigène d'intérêt a été déterminée par la technique d'ELISA indirecte. La quantité d'IFN $\alpha$  retrouvée dans le volume exclu est de 30  $\mu$ g alors que 1000  $\mu$ g d'IFN ont été utilisés pour préparer le produit immunogène, sans perte mesurable d'antigène durant le procédé de préparation. Le pourcentage de molécules d'antigène d'intérêt liées à la molécule KLH par une liaison covalente dans le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes KLH-IFN $\alpha$  peut donc être estimé à environ 3 %

**Exemple 14 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe gp160-IFN $\alpha$**

**1. Antigénicité**

Le complexe gp160-IFN $\alpha$  humain présente une antigénicité identique à l'antigénicité de la protéine gp160 ainsi qu'à celle de l'IFN $\alpha$  humain.

**2. Isoélectrofocalisation suivie d'un Western Blot.**

La figure 4 montre que l'hétérocomplexe gp160-IFN $\alpha$  humain migre sous la forme d'une seule bande à un pI qui est très différent du pI de la protéine gp160 recombinante le constituant. Le pI de cet hétérocomplexe est légèrement inférieur à celui de l'IFN $\alpha$ .

**Exemple 15 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe gp160-Tat toxoïde**

**1. Antigénicité**

Le complexe gp160-Tat Toxoid présente une antigénicité identique à l'antigénicité de la protéine gp160 et à celle de la protéine Tat.

**Exemple 16 : Caractérisation biochimique de l'hétérocomplexe gp160-Tat GM**

**1-Antigénicité**

Le complexe gp160-Tat GM présente une antigénicité identique à l'antigénicité de la protéine gp160 et à celle de la protéine Tat.

**Exemples d'activité immunogénique des hétérocomplexes**

**Exemple 17 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe KLH-VEGF murin**

**A. Matériel et méthodes**

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation KLH-VEGF murin par rapport à celle du VEGF murin a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

**1-immunisation**

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 8 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

**2-toxicité**

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (50 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

## **B. Résultats :**

### **1. Absence de toxicité de l'hétérocomplexe *in vivo* et *in vitro***

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de KLH-VEGF murin que par le VEGF murin uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de KLH-VEGF murin ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 50 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

### **2-Réponse humorale**

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre le VEGF murin, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3). La figure 5 représente les titres en anticorps obtenus.

Les souris immunisées avec la préparation KLH-VEGF murin présentent des titres d'anticorps de type IgG plus importants que ceux des souris immunisées avec le VEGF murin uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique du VEGF, facteur de croissance sélectif des cellules endothéliales. Des cellules endothéliales (HUVECs) sont cultivées dans des puits à fond plat d'une plaque de microculture à raison de 3000 cellules par puits. Les sérums de chaque groupe de souris ont été regroupés. Différentes dilutions de ces pools de sérums (1/100 – 1/800) prélevés à J-2 et J72 ont été pré-incubées pendant 2 heures avec 20 ng/ml de VEGF murin puis déposées sur ces cellules endothéliales. La culture cellulaire s'est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 3 jours. 18 heures avant la fin de l'incubation, 0.5 µCi de thymidine tritiée/puits sont ajoutés. Les sérums neutralisants empêchent le VEGF murin d'induire la prolifération des cellules endothéliales, alors que les sérums non neutralisants permettent la prolifération de ces cellules. Les résultats sont

donnés en pourcentage de neutralisation. La figure 6 présente les résultats obtenus.

Les anticorps induits par le complexe ont un pouvoir neutralisant plus important que celui induit par le VEGF murin.

5

### **Exemple 18 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe KLH-VEGF humain**

10

#### **A. Matériel et méthodes**

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation KLH-VEGF humain par rapport à celle du VEGF humain a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

15

#### **1-immunisation**

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 8 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

20

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

25

#### **2-toxicité**

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (50 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaires réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

30

### **B. Résultats :**

#### **1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro**

35

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de KLH-VEGF humain que par le VEGF humain uniquement ne présentent aucun signe

clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de KLH-VEGF humain ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 50 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

## 2-Réponse humorale

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre le VEGF humain, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3). La figure 7 représente les titres en anticorps obtenus.

Les souris immunisées avec la préparation KLH-VEGF humain présentent des titres d'anticorps de type IgG plus importants que ceux des souris immunisées avec le VEGF humain uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique du VEGF, facteur de croissance sélectif des cellules endothéliales. Des cellules endothéliales (HUVECs) sont cultivées dans des puits à fond plat d'une plaque de microculture à raison de 3000 cellules par puits. Les sérums de chaque groupe de souris ont été regroupés. Différentes dilutions de ces pools de sérums (1/100 – 1/800) prélevés à J-2 et J72 sont pré-incubées pendant 2 heures avec 20 ng/ml de VEGF humain puis déposées sur ces cellules endothéliales. La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 3 jours. 18 heures avant la fin de l'incubation, 0.5 µCi de thymidine tritiée/puits sont ajoutés. Les sérums neutralisants empêchent le VEGF humain d'induire la prolifération des cellules endothéliales, alors que les sérums non neutralisants permettent la prolifération de ces cellules. Les résultats sont donnés en pourcentage de neutralisation. La figure 8 présente les résultats obtenus.

Les anticorps induits par le complexe ont un pouvoir neutralisant plus important que celui induit par le VEGF humain.

## **Exemple 18 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe KLH-IL4 murin**

### **A. Matériel et méthodes**

5 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation KLH-IL4 murin par rapport à celle de l'IL4 murin a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

#### **1-immunisation**

10 Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 8 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 à J72

15 3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

14 jours après la dernière immunisation, les souris contrôles et les souris immunisées avec le KLH-IL4 murin sont challengées avec du pollen de bouleau en présence d'alun (100 µg/souris) en sous-cutanée à J74, J95 et J109. Des prélèvements sanguins sont effectués régulièrement pour 20 suivre l'apparition des anticorps de classe G et E dirigés contre le Bet v 1, allergène majeur du pollen de bouleau.

#### **2-toxicité**

25 La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (50 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

30

### **B. Résultats :**

#### **1. Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro**

35 Les souris immunisées aussi bien par la préparation de KLH-IL4 murin que par l'IL4 murin uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des

doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de KLH-IL4 murin ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 50 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

## 2-Réponse humorale

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre l'IL4 murin, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3). La figure 9 représente les titres en anticorps obtenus.

Les souris immunisées avec la préparation KLH-IL4 murin présentent des titres d'anticorps de type IgG plus importants que ceux des souris immunisées avec le IL4 murin uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps présents chez les souris immunisées avec la préparation KLH-IL4 murin a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique de l'IL4 murin. Ce test utilise les cellules HT-2, lignées cellulaires murines dont la croissance est IL4 murine -dépendante (Watson, J. 1979. *J. Exp. Med.* 150:1510.). Des cellules HT-2 sont cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de microculture à raison de 10 000 cellules par puits. Des sérums dilués au 1/50 prélevés à J-2 et J72 sont pré-incubés pendant 2 heures avec 50 ng/ml d'IL4 murin puis déposés sur les cellules HT-2. La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO2 pendant 3 jours. 4 heures avant la fin de l'incubation, 0.5 µCi de thymidine tritiée/puits sont ajoutés. Les sérums neutralisants empêchent l'IL4 murin d'induire la prolifération des cellules HT-2, alors que les sérums non neutralisants permettent la prolifération de ces cellules. Les résultats sont donnés en pourcentage de neutralisation. La figure 10 présente les résultats obtenus.

Les anticorps induits par le complexe sont neutralisants.

De plus, ces anticorps neutralisants dirigés contre l'IL4 murin empêchent la production, par ces souris, d'anticorps de type IgE dirigés contre le Bet v 1, lorsque ces dernières sont challengées avec du pollen de

bouleau. La figure 11 montre bien que les souris immunisées avec du KLH-IL4 murin possédant des IgG neutralisants dirigés contre l'IL4 murin bloquent la production d'IgE dirigés contre le Bet v 1 et commencent à produire des anticorps de type IgG dirigés contre le Bet v 1. Par contre, les souris qui n'ont pas reçu de KLH-IL4 murin, et qui n'ont donc pas d'anticorps de type IgG dirigés contre l'IL4, produisent uniquement des anticorps de type IgE dirigés contre le Bet v 1.

### 10 **Exemple 19 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe KLH-IL4 humain**

#### **A. Matériel et méthodes**

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation KLH-IL4 humain par rapport à celle de l'IL4 humain a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

##### **1-immunisation**

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 3 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

20 Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

25

##### **2-toxicité**

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (50 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

30

#### **B. Résultats :**

##### **1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro**

35



Les souris immunisées aussi bien par la préparation de KLH-IL4 humain que par l'IL4 humain uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de KLH-IL4 humain ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 50 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

## 2-Réponse humorale

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre l'IL4 humain, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3).

**Tableau 1**

		Titre	
		j-2	j72
<i>souris contrôles :</i>			
	souris contrôle 1	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 2	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 3	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
<i>souris immunisées avec l'IL4 humain :</i>			
	souris 4	<500 <sup>-1</sup>	32 000 <sup>-1</sup>
	souris 5	<500 <sup>-1</sup>	48 000 <sup>-1</sup>
	souris 6	<500 <sup>-1</sup>	16 000 <sup>-1</sup>
<i>souris immunisées avec le complexe KLH-IL4 humain :</i>			
	souris 7	<500 <sup>-1</sup>	256 000 <sup>-1</sup>
	souris 8	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>
	souris 9	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>

Les souris immunisées avec la préparation KLH-IL4 humain présentent des titres d'anticorps de type IgG plus importants que ceux des souris immunisées avec le IL4 humain uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps induits par la préparation KLH-IL4 humain a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique de l'IL4 humain. Ce test utilise les cellules TF-1, lignée cellulaire humaine dont la croissance est IL4 humaine-dépendante (Kitamura, T. et al., 1989.. J. Cell Physiol. 140:323-34). Des cellules TF-1 sont cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de microculture à raison de 10 000 cellules par puits. Des sérums dilués au 1/50 prélevés à J-2 et J72 pré-incubés pendant 2 heures avec 50 ng/ml d'IL4 humain sont ensuite déposés sur les cellules TF-1 . La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO2 pendant 3 jours. 4 heures avant la fin de l'incubation, 0.5 µCi de thymidine tritiée/puits sont ajoutés. Les sérums neutralisants empêchent l'IL4 humain d'induire la prolifération des cellules TF-1, alors que les sérums non neutralisants permettent la prolifération de ces cellules. Les résultats sont donnés en pourcentage de neutralisation. La figure 12 présente les résultats obtenus.

Les anticorps induits par le complexe sont neutralisants.

## Exemple 20 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe KLH-IFN $\alpha$

### A. Matériel et méthodes

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation KLH-IFN $\alpha$  humain par rapport à celle de l'IFN $\alpha$  humaine a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

#### 1-immunisation

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 3 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

5        **2-toxicité**

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (100 µg) selon la pharmacopée.

10        L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

**B. Résultats :**

15        **1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro**

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de KLH-IFNα humain que par l'IFNα humain uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de KLH-IFNα humain ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

20        Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

25        **2-Réponse humorale**

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre l'IFNα humain, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3). Le tableau 2 représente les titres en anticorps obtenus.

30

**TABLEAU 2**

		j-2	Titre j72
	<i>souris contrôles :</i>		
5	souris contrôle 1	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 2	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 3	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	<i>souris immunisées avec l'IFN<math>\alpha</math> :</i>		
	souris 4	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
10	souris 5	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>
	souris 6	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
	<i>souris immunisées avec le complexe KLH-IFN<math>\alpha</math> :</i>		
	souris 7	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
	souris 8	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
15	souris 9	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>

Les souris immunisées avec la préparation KLH-IFN $\alpha$  humain présentent des titres d'anticorps de type IgG équivalents à ceux des souris immunisées avec l'IFN $\alpha$  humain uniquement.

20 L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique de l'IFN $\alpha$  humain. (Rubinstein S, J Virol, 1981,755-8). Ce test de mesure d'effet antiviral a pour but d'évaluer l'inhibition de la lyse de cellules MDBK par le VSV (Vesicular Stomatitis virus) en présence d'IFN $\alpha$ . Des cellules MDBK sont cultivées dans des puits à fond rond d'une  
25 plaque de microculture à raison de 350 000 cellules par puits. Différentes dilutions de sérums (1/100 au 1/800) prélevés à J-2 et J72 sont pré-incubées pendant 2 heures avec 5 ng/ml d'IFN $\alpha$  humain puis déposées sur les cellules MDBK. Après 20 heures de culture cellulaire réalisée à 37°C en atmosphère  
30 humide chargée à 5 % de CO<sub>2</sub>, les sérums dilués présents dans les puits sont enlevés, les cellules lavées, puis 100  $\mu$ l contenant 100 DL50 (dose létale 50 %) de virus VSV sont ajoutés. 18 heures après l'addition du virus, l'effet lytique du virus est mesuré. Les sérums neutralisants permettent au

VSV de lyser les cellules, alors que les sérums non neutralisants empêchent cette lyse. Les résultats sont donnés en pourcentage de neutralisation.

**TABLEAU 3**

5	<i>souris immunisées avec l'IFN<math>\alpha</math> :</i>				
		1/100	1/200	1/400	1/800
	souris 4 j-2	0	0	0	0
	j72	100	75	65	50
	souris 5 j-2	0	0	0	0
10	j72	100	67	60	55
	souris 6 j-2	0	0	0	0
	j72	100	72	65	60
	<i>souris immunisées avec le conjugué KLH-IFN<math>\alpha</math> :</i>				
		1/100	1/200	1/400	1/800
15	souris 7 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100
	souris 8 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100
	souris 9 j-2	0	0	0	0
20	j72	100	100	100	100

Les anticorps induits par le complexe ont un pouvoir neutralisant plus important que celui induit par l'IFN $\alpha$  humain. Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

25

**Exemple 21 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe gp160-IFN $\alpha$**

**A. Matériel et méthodes**

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation gp160-IFN $\alpha$  humain par rapport à celle de l'IFN $\alpha$  humaine a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

30

### 1-immunisation

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 3 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

### 2-toxicité

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (100 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

## B. Résultats :

### 1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de gp160-IFN $\gamma$  humain que par l'IFN $\alpha$  humain uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de gp160-IFN $\alpha$  humain ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de l'hétérocomplexe ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

### 2-Réponse humorale

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre l'IFN $\gamma$  humain, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3).

**TABLEAU 4**

		Titre	
		j-2	j72
<i>souris contrôles :</i>			
5	souris contrôle 1	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 2	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 3	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
<i>souris immunisées avec l'IFN<math>\alpha</math> :</i>			
10	souris 4	<500 <sup>-1</sup>	64 000 <sup>-1</sup>
	souris 5	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
	souris 6	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>
<i>souris immunisées avec le complexe gp160-IFN<math>\alpha</math> :</i>			
15	souris 7	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
	souris 8	<500 <sup>-1</sup>	96 000 <sup>-1</sup>
	souris 9	<500 <sup>-1</sup>	64 000 <sup>-1</sup>

20 Les souris immunisées avec la préparation gp160-IFN $\alpha$  humain présentent des titres d'anticorps de type IgG équivalents à ceux des souris immunisées avec l'IFN $\alpha$  humain uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'activité biologique de l'IFN $\alpha$  humain décrit dans l'exemple précédant. Les  
25 résultats sont données en % de neutralisation.

**TABLEAU 5**

		<i>souris immunisées avec l'IFN<math>\alpha</math> :</i>			
		1/100	1/200	1/400	1/800
30	souris 4 j-2	0	0	0	0
	j72	100	80	70	53
	souris 5 j-2	0	0	0	0
	j72	100	70	65	50
	souris 6 j-2	0	0	0	0
35	j72	100	65	60	57

**TABLEAU 5 (suite)***souris immunisées avec le conjugué gp160-IFN $\alpha$  :*

		1/100	1/200	1/400	1/800
	souris 7 j-2	0	0	0	0
5	j72	100	100	100	100
	souris 8 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100
	souris 9 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100

10

Les anticorps induits par le complexe ont un pouvoir neutralisant plus important que celui induit par l'IFN $\alpha$  humain.

15 **Exemple 23 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe gp160-Tat toxoïde**

**A. Matériel et méthodes**

20 L'activité immunogénique (humorale et cellulaire) de la préparation gp160-Tat toxoïde par rapport à celle du Tat toxoïde a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

**1-immunisation**

25 Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 3 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10  $\mu$ g) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5  $\mu$ g en AIF est donnée à J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

30 Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

**2-toxicité**

La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose humaine (100  $\mu$ g) selon la pharmacopée.



L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée *in vitro* par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

## 5 **B. Résultats :**

### 1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe *in vivo* et *in vitro*

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de gp160-Tat  
10 toxoïde que par le Tat toxoïde uniquement ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de gp160-Tat toxoïde ne diminuent pas la prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de l'hétérocomplexe  
15 ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés, manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant l'injection.

### 2-Réponse humorale

20

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre le Tat, déterminée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3). Le tableau 1 représente les titres en anticorps obtenus.

25

**TABLEAU 6**

		Titre	
		j-2	J72
<i>souris contrôles :</i>			
30	souris contrôle 1	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 2	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>
	souris contrôle 3	<500 <sup>-1</sup>	<500 <sup>-1</sup>

**TABLEAU 6 (suite)***souris immunisées avec le Tat toxoïde :*

souris 4	<500 <sup>-1</sup>	48 000 <sup>-1</sup>
souris 5	<500 <sup>-1</sup>	64 000 <sup>-1</sup>
souris 6	<500 <sup>-1</sup>	48 000 <sup>-1</sup>

*souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat toxoïde :*

souris 7	<500 <sup>-1</sup>	64 000 <sup>-1</sup>
souris 8	<500 <sup>-1</sup>	128 000 <sup>-1</sup>
souris 9	<500 <sup>-1</sup>	64 000 <sup>-1</sup>

Les souris immunisées avec la préparation de gp160-Tat toxoïde présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-Tat plus importants que ceux des souris immunisées avec le Tat toxoïde uniquement.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du Cat assay. Différentes dilutions de sérums (1/100- 1/800) prélevés à J-2 et J72 sont incubées pendant 2 heures avec 50 ng/ml de Tat natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des cellules HeLa, cellules transfectées de manière stable avec un plasmide contenant le LTR du VIH-1 comme promoteur du gène Chloramphénicol Acétyl transférase (CAT). Après 24 heures de culture, les cellules sont lysées et la quantité de protéine CAT produite est mesurée par un test ELISA, le Cat assay, (Boehringer Mannheim). Les sérums neutralisants empêchent la protéine Tat d'induire l'expression de la protéine CAT, alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette protéine CAT. Les résultats sont données en % de neutralisation.

**TABLEAU 7***souris immunisées avec le Tat toxoïde :*

5		1/100	1/200	1/400	1/800
	souris 4 j-2	0	0	0	0
	j72	60	50	25	20
	souris 5 j-2	0	0	0	0
	j72	60	55	30	20
10	souris 6 j-2	0	0	0	0
	j72	65	50	30	30

*souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat toxoïde :*

		1/100	1/200	1/400	1/800
	souris 7 j-2	0	0	0	0
15	j72	100	100	100	100
	souris 8 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100
	souris 9 j-2	0	0	0	0
	j72	100	100	100	100

20

Les anticorps induits par le conjugué gp160-Tat toxoïde ont un pouvoir neutralisant plus important que celui induit par le Tat toxoïde.

**2. Production de MIP1 $\alpha$** 

25

La production de MIP1 $\alpha$  dans les surnageants de culture des splénocytes. Les splénocytes des souris immunisées et des souris contrôles sont isolées puis cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de micro-culture à raison de 100 000 cellules/puits en présence de 5  $\mu$ g/ml de p24, de gp160, de Tat natif et d'un mélange de 5  $\mu$ g/ml gp160 et de 5  $\mu$ g/ml de Tat natif. Les surnageants sont prélevés après 24 heures de culture et la présence de MIP1 $\alpha$  dans les surnageants est mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D. Les résultats sont exprimés en pg/ml.

30

**TABLEAU 8**

		Gp160	Tat nati	gp160 + Tat natif		p24
	<i>Souris contrôles:</i>					
5	Souris 1	j72 MIP1 $\alpha$	95	90	145	9
	Souris 2	j72 MIP1 $\alpha$	100	90	136	7
10	Souris 3	j72 MIP1 $\alpha$	120	110	132	9
	<i>Souris immunisées par le Tat toxoïde:</i>					
	Souris 4	j72 MIP1 $\alpha$	145	130	190	7
15	Souris 5	j72 MIP1 $\alpha$	128	145	225	9
	Souris 6	j72 MIP1 $\alpha$	150	230	295	10
	<i>Souris immunisées par le conjugué gp160-Tat toxoïde</i>					
20	Souris 7	j72 MIP1 $\alpha$	875	736	1725	9
	Souris 8	j72 MIP1 $\alpha$	945	905	1900	7
	Souris 9	j72 MIP1 $\alpha$	1025	795	1755	8

25 Les splénocytes des souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat toxoïde produisent plus de chimiokines MIP1 $\alpha$  que les cellules des souris immunisées par le Tat toxoïde uniquement lorsqu'elles sont activées, *in vitro*, par les immunogènes utilisés lors de l'immunisation.

#### **4. Prolifération des splénocytes de souris immunisées (test CMI)**

30

Les splénocytes des souris immunisées et des souris contrôles sont isolées puis cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de micro-culture à raison de 100 000 cellules/puits en présence de p24, de gp160, de Tat natif et d'un mélange de gp160 et de Tat natif. La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 6 jours. 18 heures avant la fin de l'incubation, 0.5  $\mu$ Ci de thymidine tritiée/ puits sont ajoutés. L'intensité de la réponse immunitaire est proportionnelle à l'index de prolifération Ip.

35

Ip = cpm (coups par minute) pour l'antigène donné / cpm contrôle

**TABLEAU 9**

	Gp160	Tat natif	gp160 + Tat natif	p24
5	<i>Souris contrôles :</i>			
	Souris 1 j72	1,1	1	1,2
	Souris 2 j72	1	1,1	1,1
	Souris 3 j72	1,2	1	1,1
10	<i>Souris immunisées avec le Tat toxoïde</i>			
	Souris 4 j72	1,2	8	10
	Souris 5 j72	1	9	9
	Souris 6 j72	1	10	9
	<i>Souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat toxoïde :</i>			
15	Souris 7 j72	9	11	8
	Souris 8 j72	10	9	7,5
	Souris 9 j72	10,5	9	8

20 Les splénocytes des souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat toxoïde ou le Tat toxoïde, prolifèrent, lorsqu'elles sont activées, in vitro, avec les immunogènes utilisés lors de l'immunisation.

**Exemple 24 : Activité immunogénique de l'hétérocomplexe gp160-Tat GM**

**A. Matériel et méthodes**

L'activité immunogénique (humorale et cellulaire) de la préparation gp160-Tat GM par rapport à celle du Tat toxoïde a été étudiée chez la souris balb c de 18-20 g.

**1-immunisation**

Au jour 0, 7, 14, 21 un groupe de 3 souris reçoit une injection de 0.1 ml (10 µg) d'une émulsion en AIF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J60.

35 Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2

3 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Les souris sont sacrifiées 12 jours après la dernière immunisation.

## 5 2-toxicité

----- La toxicité anormale est recherchée chez 3 souris recevant 1 dose -----  
humaine (100 µg) selon la pharmacopée.

L'absence d'immunotoxicité de l'hétérocomplexe est évaluée in vitro  
par un test de prolifération cellulaire réalisé sur des PBMCs cultivées en  
10 présence du complexe et stimulées par du PPD ou du Tétanos toxoïde.

## B. Résultats :

### 1-Absence de toxicité de l'hétérocomplexe in vivo et in vitro

15

Les souris immunisées aussi bien par la préparation de gp160-Tat  
GM que par le Tat toxoïde uniquement ne présentent aucun signe clinique et  
aucune lésion anatomique. Le test d'immunosuppression montre que des  
doses de 100 ng/ml à 1 µg/ml de gp160-Tat toxoïde ne diminuent pas la  
20 prolifération des lymphocytes.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de l'hétérocomplexe  
ne manifeste de signes de toxicité (température, troubles cutanés,  
manifestations systémiques ou régionales) pendant les 7 jours suivant  
25 l'injection.

### 2-Réponse humorale

La réponse humorale est mesurée par la présence dans le sérum  
30 d'anticorps de type IgG dirigés contre le Tat, déterminée par ELISA et  
exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique  
supérieure à 0.3). Le tableau 1 représente les titres en anticorps obtenus.

TABLEAU 10

		Titre	
		j-2	J72
<i>souris contrôles :</i>			
5	souris contrôle 1	<500-1	<500-1
	souris contrôle 2	<500-1	<500-1
	souris contrôle 3	<500-1	<500-1
<i>souris immunisées avec le Tat GM :</i>			
10	souris 4	<500-1	64 000-1
	souris 5	<500-1	64 000-1
	souris 6	<500-1	48 000-1
<i>souris immunisées avec le conjugué gp160-Tat GM :</i>			
15	souris 7	<500-1	128 000-1
	souris 8	<500-1	128 000-1
	souris 9	<500-1	64 000-1

20 Les souris immunisées avec la préparation de gp160-Tat GM présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-Tat plus importants que ceux des souris immunisées avec le Tat GM uniquement.

## REFERENCES

- Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC.  
 5 Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-  
 beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. J Urol 1999;161:182-7
- Aucouturier J et al, Adjuvants designed for veterinary and human vaccines.  
 Vaccine 2001 19 :2666-72
- Baras B. et al, Single-dose mucosal immunization with biodegradable  
 10 microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun.  
 (1999) 67:2643-8)
- Basak A, Boudreault A, Chen A, Chretien M, Seidah NG, Lazure C.,  
 Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the  
 production of prohormone convertases antibodies: synthesis,  
 15 characterization and use of 8-branched immunogenic peptides. : J Pept Sci.  
 1995 Nov-Dec;1(6):385-95
- Cowan et al, Induction of TNF alpha in human neuronal cells by extracellular  
 human T-cell lymphotropic virus Type 1 Tax1, Journal of virology, 1997,  
 6982-6989.
- 20 Ferreira FK et al, 1993, Purification and characterization of recombinant Bet  
 v1, the major Birch pollen allergen : immunological equivalence to natural Bet  
 v1; J. Biol. Chem., 268 : 19574.
- Le Buanec et al, HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both  
 cellular immunosuppression and angiogenic processes. Biomed  
 25 Pharmacother. 1999;53: 424-31.
- Morgenstern JP et al, Amino acid sequence of Feld1, the major allergen of  
 the domestic cat : protein sequence analysis and cDNA cloning., PNAS,  
 1991, 88 : 9690
- Mori N et al, Interleukine-10 gene expression in adult t-cell leukaemia, Blood,  
 30 1996, 1035-45.



Sementchenko VI, Schweinfest CW, Papas TS, Watson DK., ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. *Oncogene* 1998;17:2883-8

Tovey ER et al, Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*, 1981. 289 : 592-593.

---

Yoshiji H et al, Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996, 56 :2013-6

10 Zagury D et al, Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95 : 3851-6

Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smirnoff P, Tendler Y, Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J. Comparative study of the role of serum levels of p53 antigen and its tumor cell concentration in colon cancer detection. *Hum Antibodies Hybridomas*.  
15 (1996)

## REVENDICATIONS

1. Produit immunogène stable pour l'induction d'anticorps à l'encontre d'une ou plusieurs protéines antigéniques chez un sujet, caractérisé en ce qu'il comprend des hétérocomplexes immunogènes protéiques constitués d'associations entre (i) des molécules de protéines antigéniques et (ii) des molécules protéiques porteuses et en ce que moins de 40 pour cent des protéines antigéniques (i) sont liées avec les molécules protéiques porteuses (ii) par une liaison covalente.
2. Produit immunogène selon la revendication 1, caractérisé en ce que chaque hétérocomplexe comprend (i) une pluralité de protéines antigéniques liées à (ii) une molécule protéique porteuse.
3. Produit immunogène selon la revendication 2, caractérisé en ce que, pour chaque hétérocomplexe immunogène, la pluralité de protéines antigéniques (i) est constituée d'une pluralité d'exemplaires d'une protéine antigénique unique.
4. Produit immunogène selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que, pour chaque hétérocomplexe immunogène, les protéines antigéniques (i) sont constituées d'une pluralité d'exemplaires d'une protéine normalement reconnue comme une protéine du soi par les cellules du système immunitaire dudit sujet.
5. Produit selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend de 5 à 50 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii), de préférence de 20 à 40 protéines antigéniques (i) pour une molécule protéique porteuse (ii).
6. Produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre une ou plusieurs des protéines antigéniques (i) et la molécule protéique porteuse (ii) sont réalisées par l'intermédiaire d'un agent chimique de liaison bifonctionnel.
7. Produit immunogène selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit agent chimique de liaison comprend au moins deux fonctions aldéhydes libres.
8. Produit immunogène selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit agent de liaison est le glutaraldéhyde.

9. Produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la ou les protéines antigéniques (i) consistent en des cytokines produites naturellement par ledit sujet.

10. Produit immunogène selon la revendication 9, caractérisé en ce que la ou les protéines antigéniques (i) sont choisies parmi l'interleukine-4, l'interféron alpha, l'interféron gamma, le VEGF, l'interleukine-10, le TNF alpha, le TGF bêta, l'interlukine-5 et l'interleukine 6.

11. Produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la ou les protéines antigéniques (i) sont choisies parmi la protéine E7 d'un papillomavirus, la protéine Tat du virus VIH 1, la protéine Tax d'un virus HTLV 1 ou HTLV 2 et la protéine p53 du soi.

12. Produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est une protéine immunogène induisant la production de lymphocytes cytotoxiques dirigés à l'encontre de cellules présentant à leur surface ladite molécule protéique porteuse, ou tout peptide qui en est dérivé, en association avec des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC).

13. Produit immunogène selon la revendication 12, caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines L1, L2 et E7 d'un Papillomavirus.

14. Produit immunogène selon la revendication 12, caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines gp160, p24, p17, Nef et Tat du virus HIV1.

15. Produit immunogène selon la revendication 12, caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines CEA, p53, Di12, CaSm, OSA et ETS2.

16. Produit immunogène selon la revendication 12, caractérisé en ce que la molécule protéique porteuse (ii) est choisie parmi les protéines allergènes telles que Bet v 1, Der p 1 et Fel d 1.

17. Produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les produits comprenant les hétéro complexes suivants, dans lesquels les protéines antigéniques (i), d'une part et la molécule porteuse protéique (ii), d'autre part, sont respectivement :

a) (i) IL-4 et (ii) KLH ;

b) (i) interféron alpha et (ii) KLH ;

c) (i) VEGF et (ii) KLH ;

d) (i) IL-10 et (ii) KLH ;

e) (i) interféron alpha et (ii) gp160 de VIH1

f) (i) IL-4 et (ii) l'antigène allergène Bet v 1 ; et

5 g) (i) le VEGF et (ii) la protéine E7 d'un Papillomavirus.

h) la protéine Tat de VIH1 inactivée et (ii) la protéine gp120 de VIH1.

18. Composition comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17.

10 19. Composition pharmaceutique comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

20. Composition immunogène comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

15 21. Composition vaccinale comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

20 22. Procédé de préparation d'un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) incuber les protéines antigéniques (i) et la molécule porteuse (ii) dans un rapport molaire (i) : (ii) de 10::1 à 50::1, en présence d'un agent chimique de liaison;

25 b) récupérer le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes qui est préparé à l'étape a);

23. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'agent chimique de liaison est le glutaraldéhyde.

30 24. Procédé selon l'une des revendications 22 et 23, caractérisé en ce que l'étape a) est suivie d'une étape de stabilisation des hétérocomplexes immunogènes par le formaldéhyde, préalablement à l'étape b) de récupération du produit immunogène.

c) (i) VEGF et (ii) KLH ;

d) (i) IL-10 et (ii) KLH ;

e) (i) interféron alpha et (ii) gp160 de VIH1

f) (i) IL-4 et (ii) l'antigène allergène Bet v 1 ; et

5 g) (i) le VEGF et (ii) la protéine E7 d'un Papillomavirus.

h) la protéine Tat de VIH1 inactivée et (ii) la protéine gp120 de VIH1.

18. Composition comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17.

10 19. Composition pharmaceutique comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

20. Composition immunogène comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

15 21. Composition vaccinale comprenant un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

20 22. Procédé de préparation d'un produit immunogène selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) incuber les protéines antigéniques (i) et la molécule porteuse (ii) dans un rapport molaire (i) : (ii) de 10::1 à 50::1, en présence d'un agent chimique de liaison;

25 b) récupérer le produit immunogène comprenant des hétérocomplexes immunogènes qui est préparé à l'étape a);

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'agent chimique de liaison est le glutaraldéhyde.

30 24. Procédé selon l'une des revendications 22 et 23, caractérisé en ce que l'étape a) est suivie d'une étape de stabilisation des hétérocomplexes immunogènes par le formaldéhyde, préalablement à l'étape b) de récupération du produit immunogène.

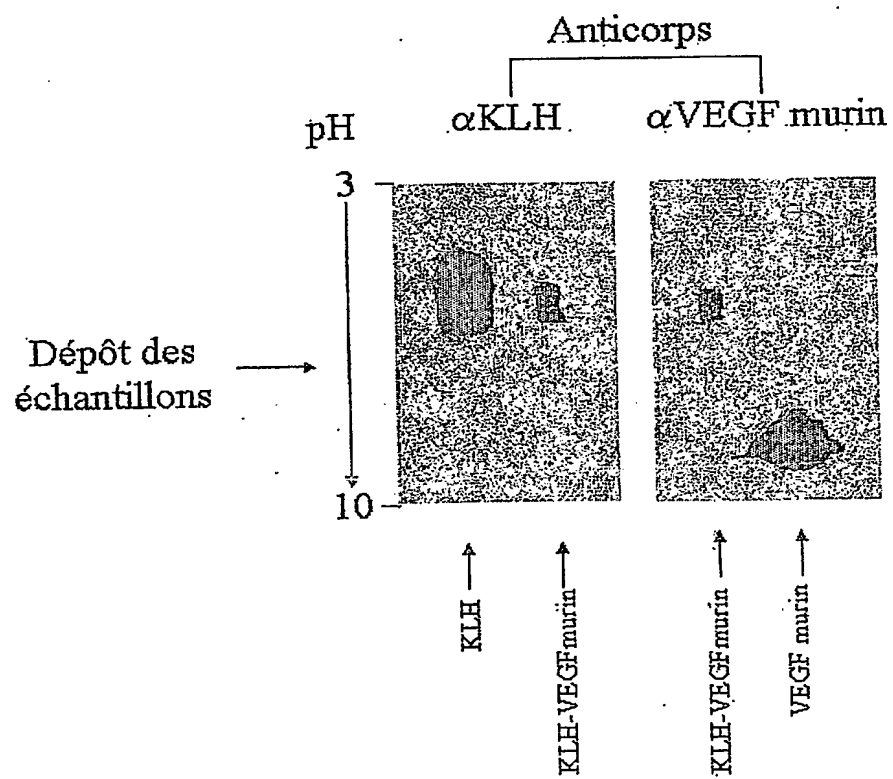


Figure 1

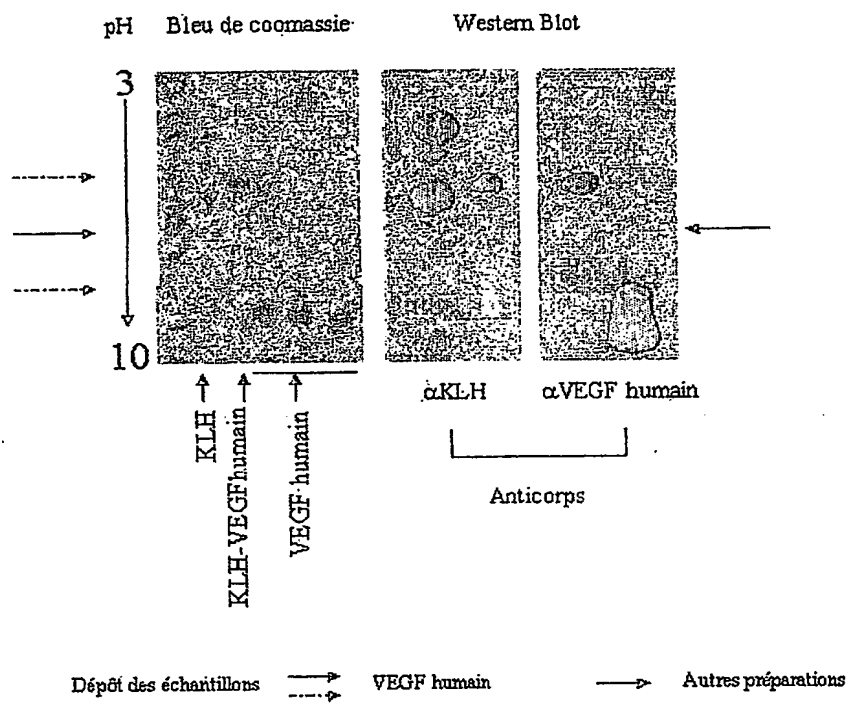


Figure 2

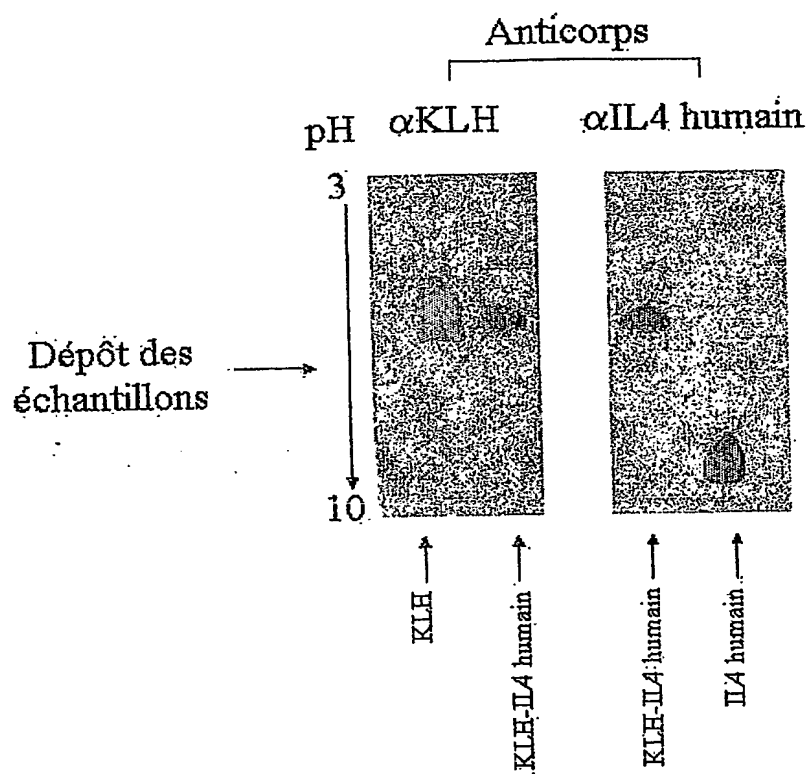


Figure 3



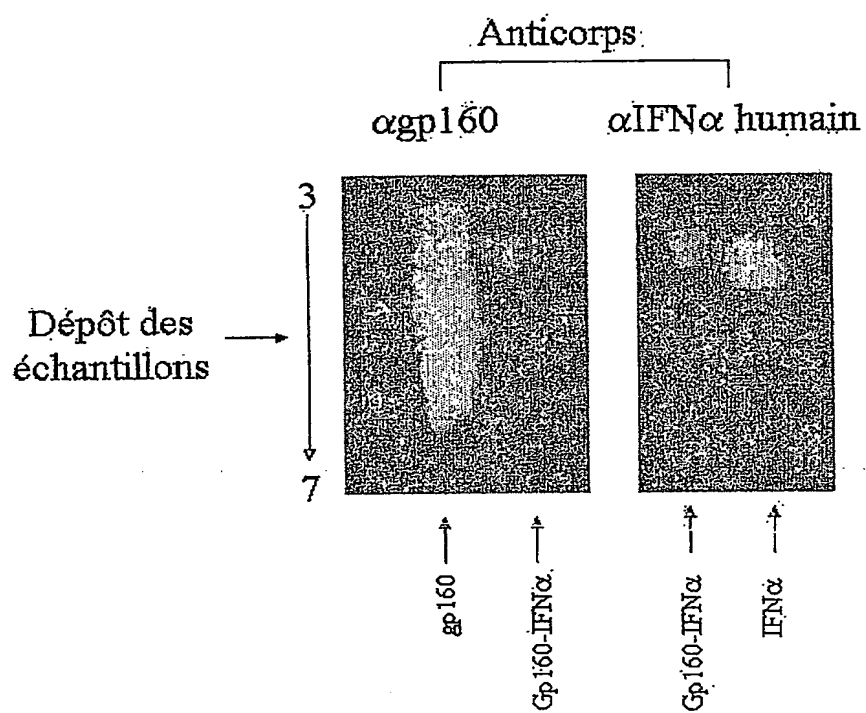


Figure 4

☐ Serum avant immunisation
 ☒ Serum après immunisation

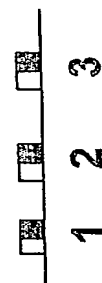
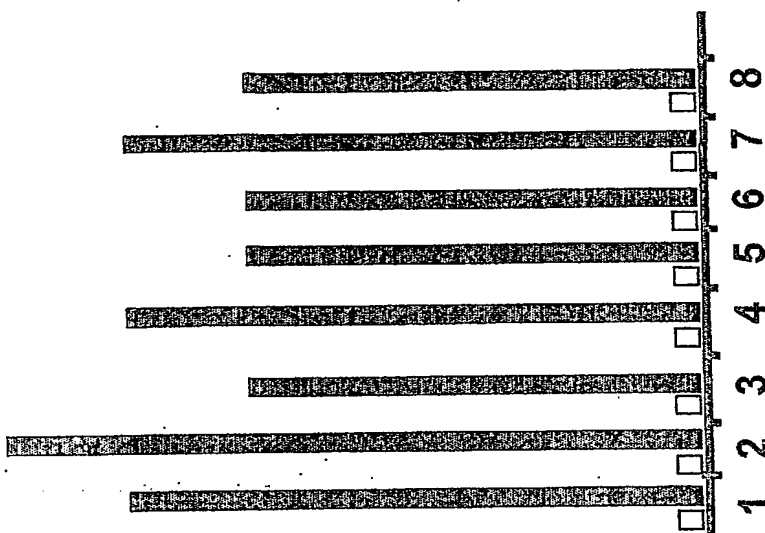
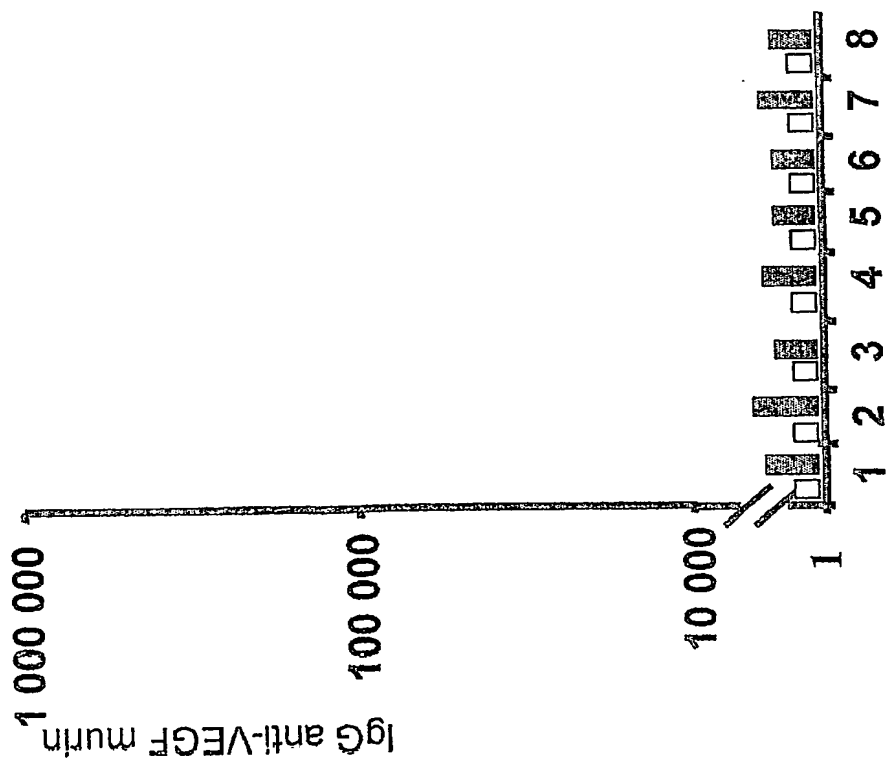


Figure 6

Serum dilution :  $\square$  1/100  $\blacksquare$  1/200  $\boxplus$  1/400  $\boxtimes$  1/800

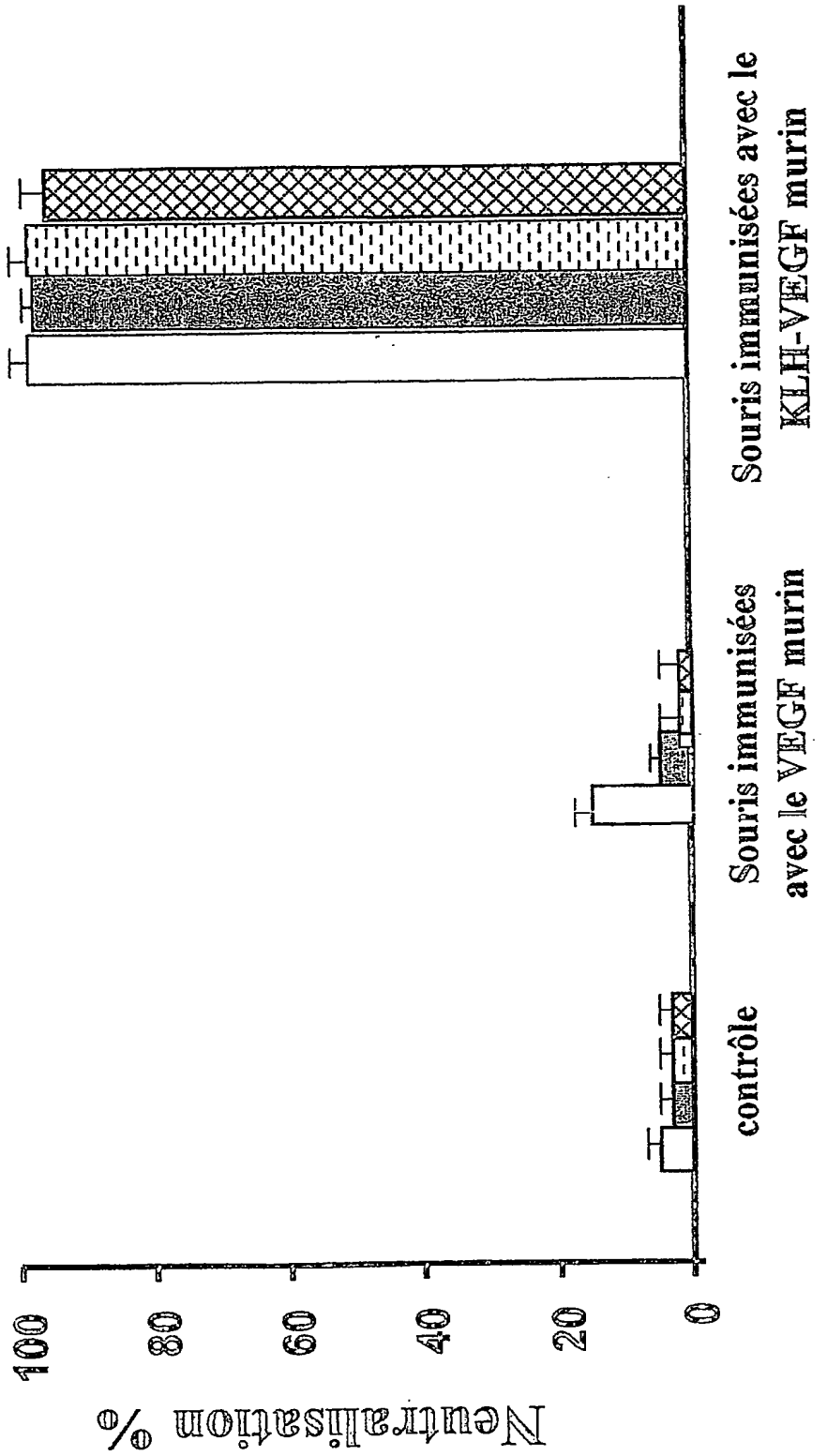


Figure 7

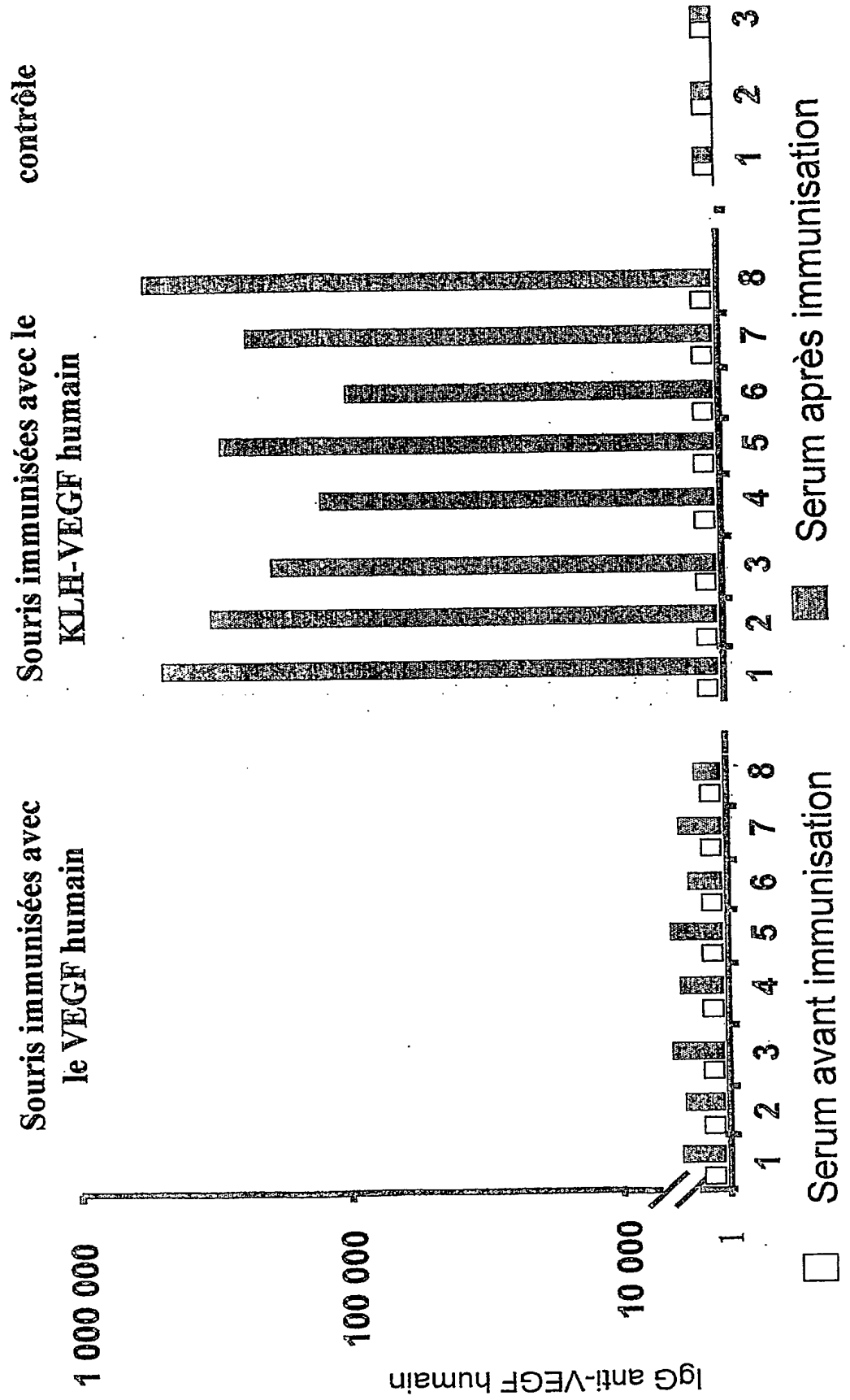
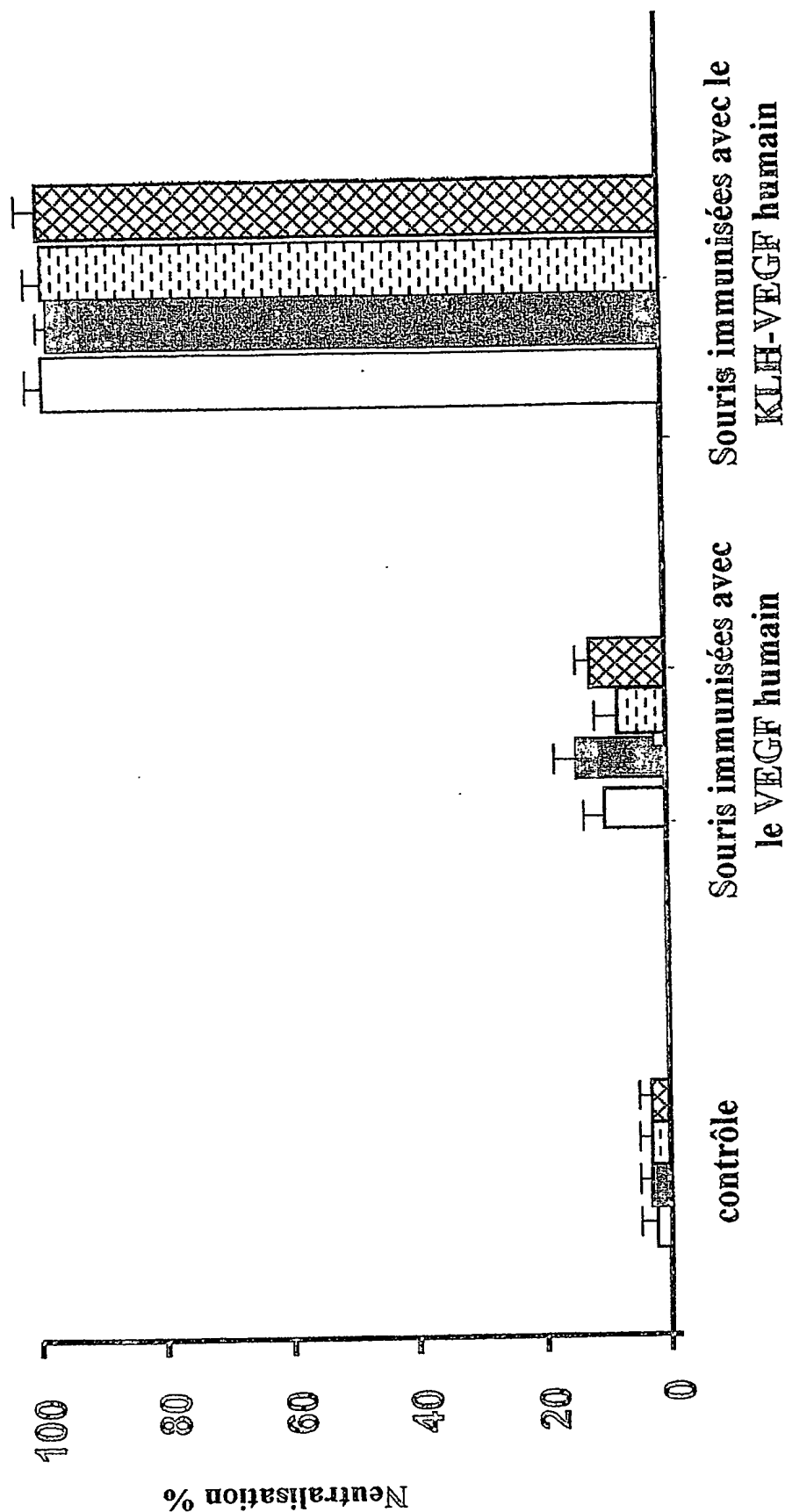


Figure 8

Serum dilution :  $\square$  1/100  $\blacksquare$  1/200  $\boxplus$  1/400  $\boxtimes$  1/800



9/12

Figure 9

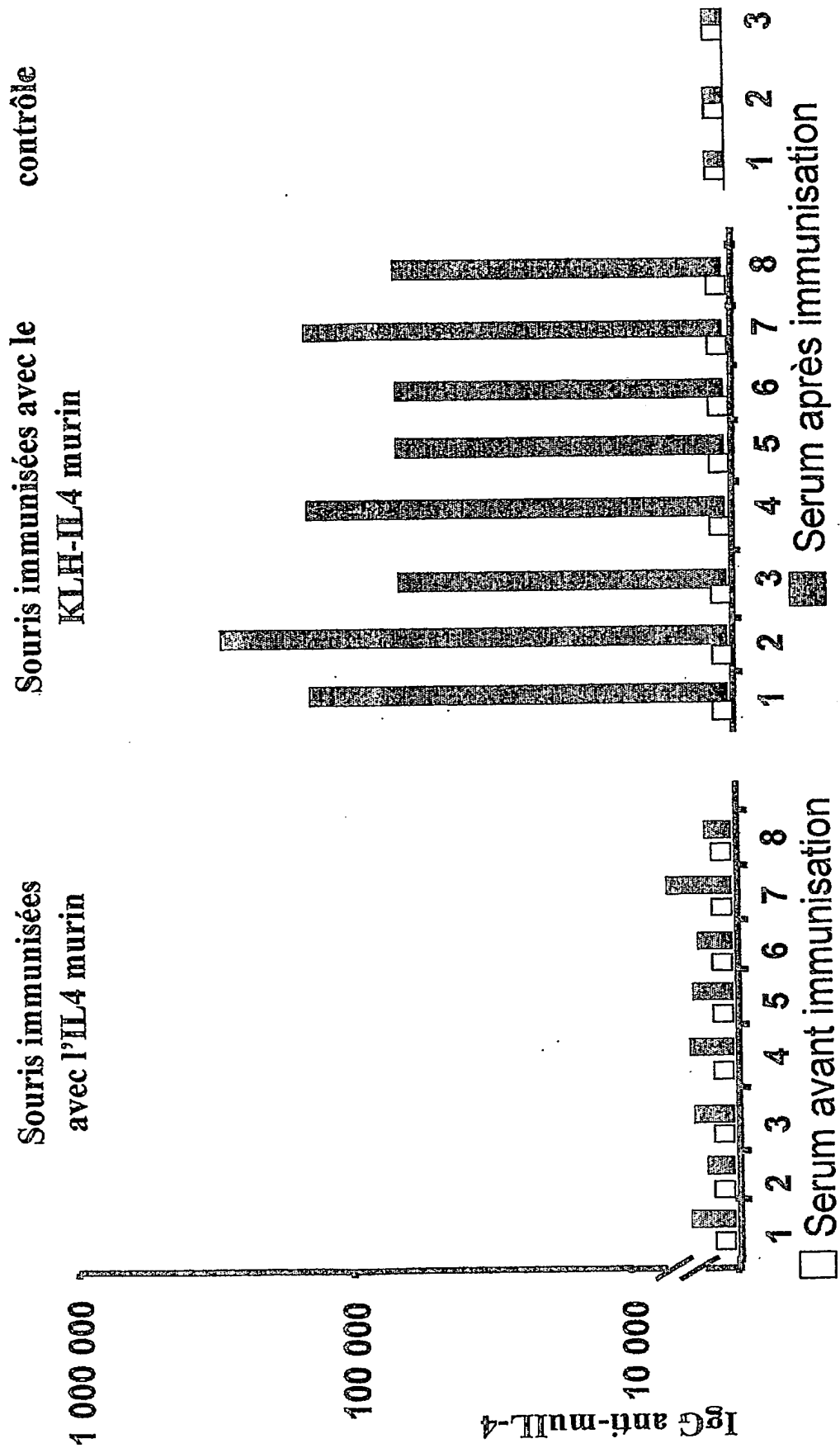


Figure 10

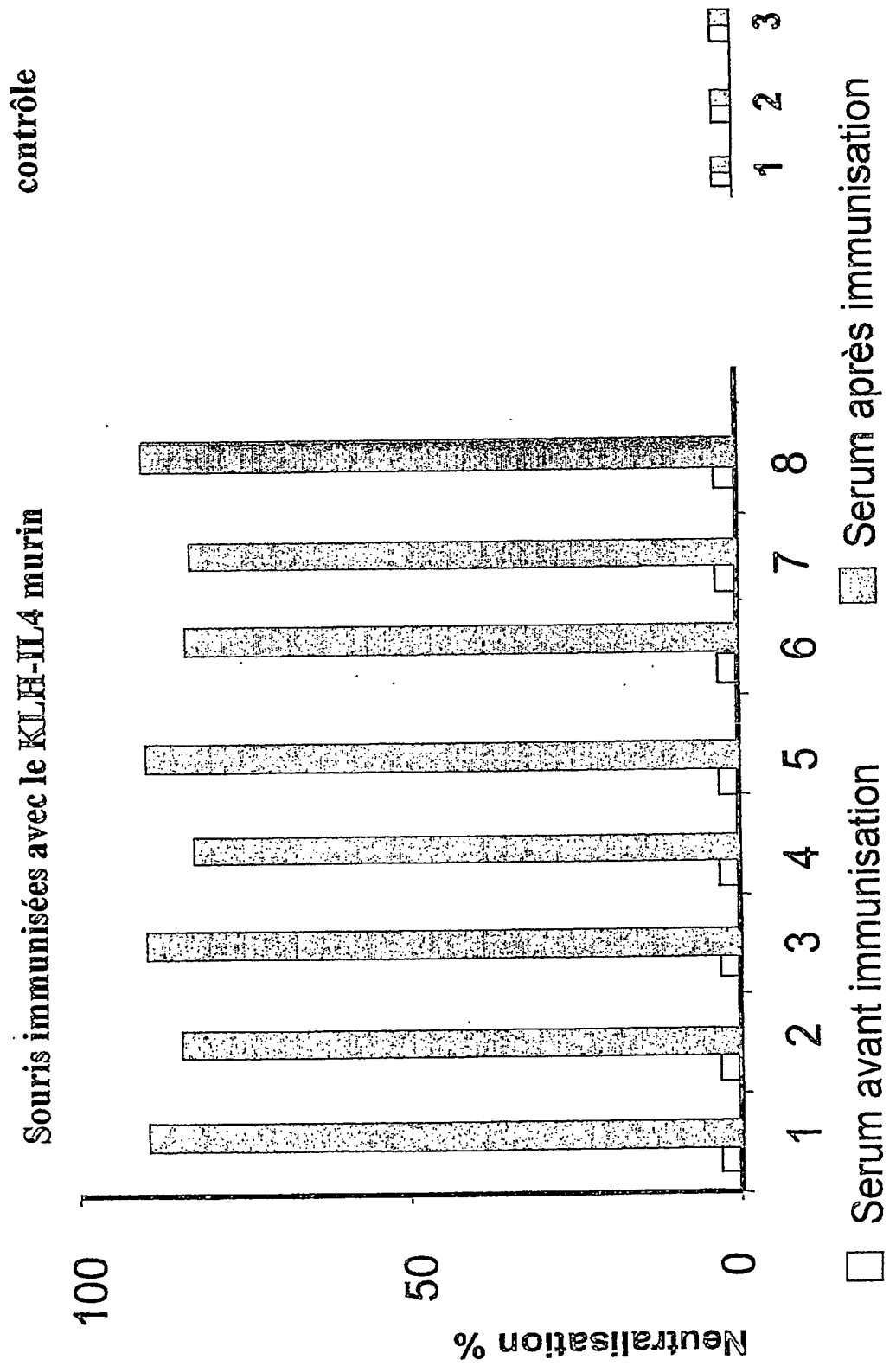


Figure 11

IgE anti-BETV1  
(dilution du serum  $10^{-1}$ )

IgG anti-BETV1  
(dilution du serum  $500^{-1}$ )

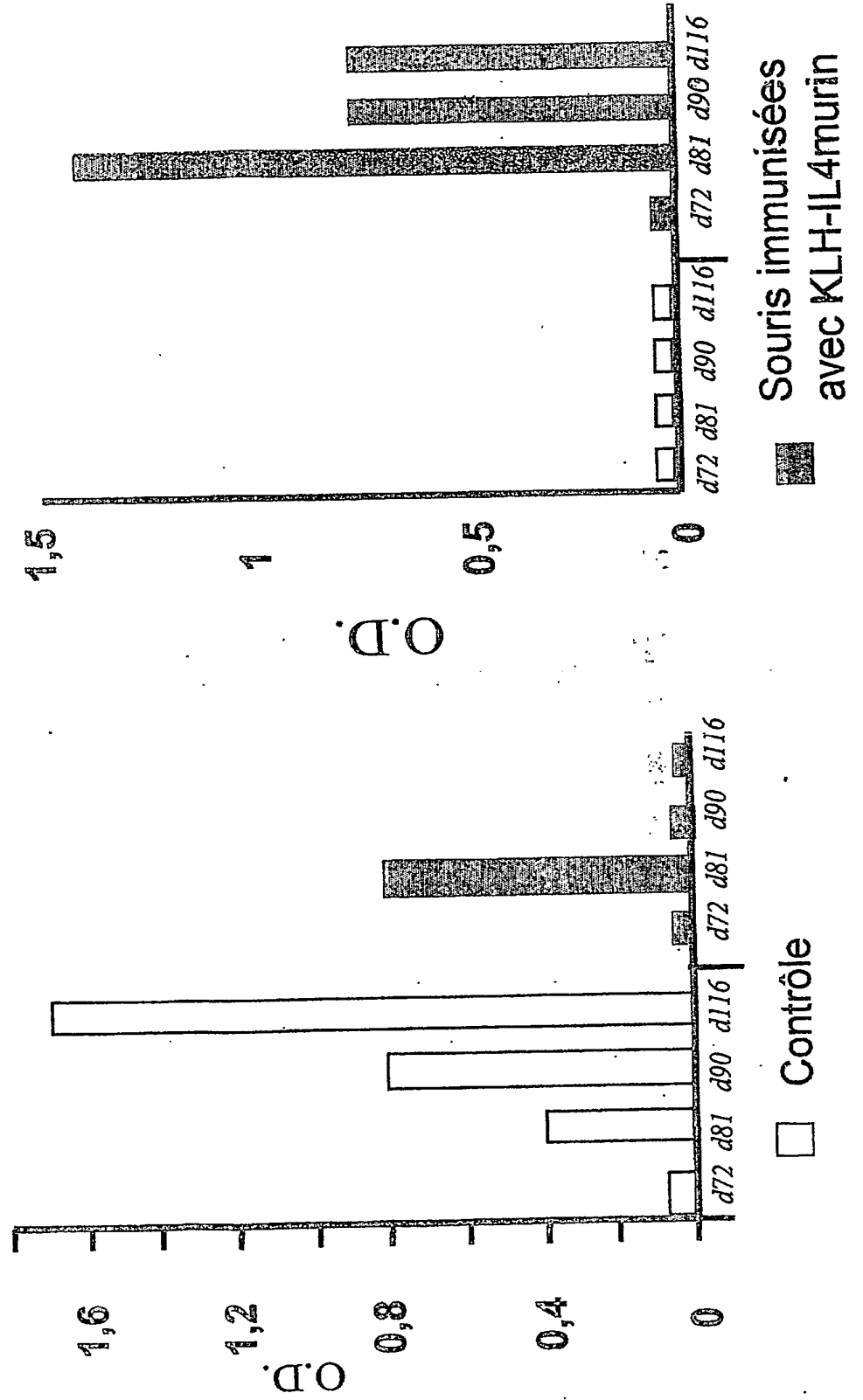
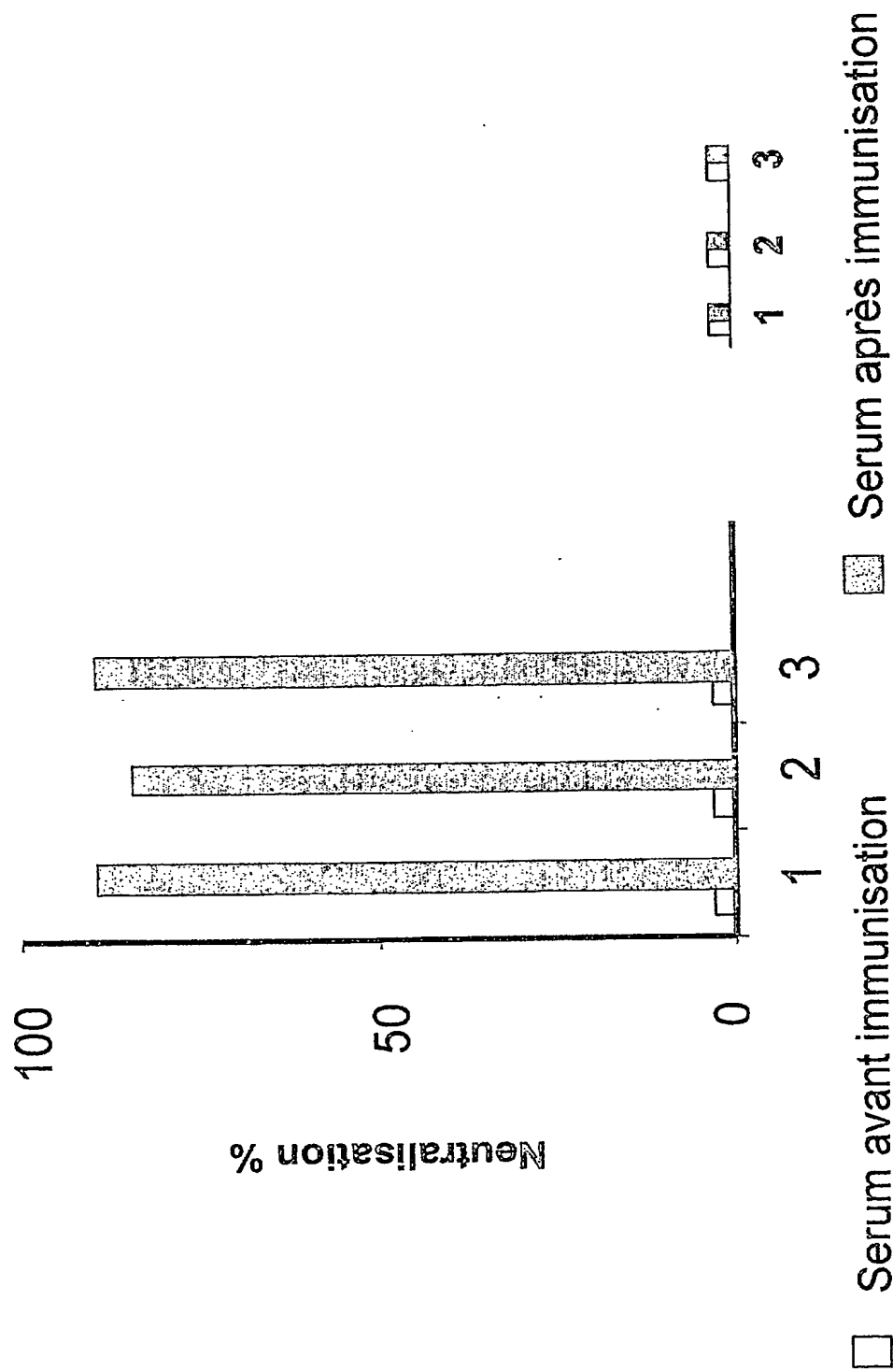




Figure 12

Souris immunisées avec le KLH-IL4 humain

contrôle

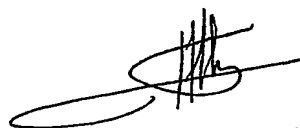


# BREVET D'INVENTION

## Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	P334 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0211455
TITRE DE L'INVENTION	
	PRODUIT IMMUNOGENE STABLE COMPRENANT DES HETEROCOMPLEXES ANTIGENIQUES COMPOSITIONS LES CONTENANT ET PROCEDE DE PREPARATION.
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	Alain CATHERINE
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	LE BUANEC
Prénoms	Hélène
Rue	29, rue Poliveau
Code postal et ville	75005 PARIS
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	COHEN
Prénoms	Paul
Rue	21, quai de Bourbon
Code postal et ville	75004 PARIS
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	PELTRE
Prénoms	Gabriel
Rue	31, rue Croulebarbe
Code postal et ville	75013 PARIS
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	ZAGURY
Prénoms	Daniel
Rue	1, Avenue Frédéric Le Play
Code postal et ville	75007 PARIS
Société d'appartenance	
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE	PARIS, LE 31 JANVIER 2003

si n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



CATHERINE Alain  
C.P.I. bm (92-1045 i)  
Cabinet HARLE ET PHELIP

PCT Application  
**FR0302733**

